

聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒简明说明书 (DC3512)

产品简介

聚丙烯酰胺凝胶 DNA 纯化试剂盒是专门用于快速、高效地从聚丙烯酰胺凝胶中回收得到 ssDNA 或 dsDNA 而设计的产品。PAGE 电泳后，寡核苷酸可通过紫外或溴化乙锭染色可视化，然后剪切、浸泡，通过凝胶洗脱液洗脱。在洗脱液中加入一种特殊配方的结合缓冲液，使得 DNA 吸附结合，当蛋白质、盐离子、缓冲液及其他杂质通过洗涤缓冲液去除后，DNA 被无菌去离子水或低盐洗脱液洗脱。此外，提供的 Mini Column 可同时处理多个样品。纯化后的 DNA 适用于 PCR、连接反应、杂交等实验。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	4	50	250
Mini Columns	4	50	250
2.0 mL Collection Tubes	4	50	250
1.5 mL Microfuge Tubes	4	50	250
Poly-Gel Filter Units	4	50	250
Gel Elution Buffer	1.2 mL	15 mL	70 mL
Buffer GC	8 mL	100 mL	2×250 mL
DNA Wash Buffer	2 mL	15 mL	3×24 mL
Elution Buffer	500 µL	7 mL	30 mL
User Manual	1	1	1

要点

- DNA Wash Buffer: 使用前将 8 mL (DC3512-00) 或 60 mL

(DC3512-01) 或 96 mL (DC3512-02) 96-100%乙醇加入至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。在较冷的环境下，一些缓冲液可能会形成结晶，使用前请加热溶解。

实验前需准备的材料

- 65°C 水浴锅或恒温箱
- 放射自显影胶片 (对于同位素标记的 DNA)
- 高速离心机 (10,000 x g)
- 1.5 mL 离心管

PAGE 法

聚丙烯酰胺凝胶用于分离小的 DNA 片段，通常适用于 100 bp 以下的 DNA 片段。这些凝胶通常使用低的丙烯酰胺浓度 ($\leq 6\%$) 且含有非离子变性剂尿素 (7 M)。对于特殊要求的凝胶成分和缓冲液，请参考附录。

DNA 的可视化

荧光遮蔽

紫外照射下可观察到聚丙烯酰胺凝胶上的 DNA 片段，该方法直接明了，相比于染色法 (见下面的 DNA 染色) 可能具有更高的得率。在此技术下，凝胶被置于荧光材料上，通常使用荧光薄层色谱硅胶板。然后用紫外线光源照射凝胶，凝胶中的 DNA 条带会阻碍紫外线对基质的透射，这将会导致凝胶上的暗区 (即无荧

光区)。

1. 凝胶必须从玻璃板上取下 (玻璃板阻挡紫外线，将会阻止 DNA 在紫外或染色后的可视化)，用保鲜膜包好，有利于处理和标记。取下顶部玻璃板，在凝胶上盖上保鲜膜，将凝胶和玻璃板翻转，小心剥离凝胶，把凝胶完全包裹于保鲜膜内。

注: 请使用一层保鲜膜，尽量防止凝胶和保鲜膜之间形成气泡。这些气泡会散射紫外光，使得 DNA 可视化变得困难。

2. 将凝胶置于荧光薄层色谱板的暗白色表面上，取下凝胶表面的保鲜膜。手持短波长 (254 nm) 紫外线光源照射凝胶 (长波长紫外光不工作)。凝胶下的薄层色谱板应发出明亮的紫色，除非核酸存在。DNA 条带将以阴影的形式出现。灵敏度约 0.3 µg (单个 DNA 条带)。

注: 紫外线阴影技术适用于标记或未标记的 DNA 或 RNA，因此这项技术有许多其他应用；例如限制性内切酶酶切的可视化。

DNA 染色

作为紫外线阴影的替代，聚丙烯酰胺凝胶可用吖啶橙或溴化乙锭 (EtBr) 染色后用紫外线透射使 DNA 条带位置在凝胶上可视化。若 DNA 是探针，杂交前务必将染色剂完全去除，否则会影响杂交效率。建议使用吖啶橙染色，而不是溴化乙锭，因为吖啶橙可通过我们的 Mini Column 去除 (亦可使用溴化乙锭，但需要多次丁醇萃取才能去除，然后才能将样品转移至 Mini Column)。

1. 按照紫外阴影的描述，从玻璃板取下凝胶。
2. 去除紫外凝胶上的保鲜膜，置于 2 µg/mL 的吖啶橙溶液中浸泡 15 min。将染好色的凝胶置于蒸馏水中漂洗 10 min。然后用保鲜膜将凝胶重新包裹以便处理，将凝胶置于紫外透射器，使

DNA 可视化。

3. 使用无核酸酶的手术刀或刀片，小心切下含 DNA 条带的尽可能小的凝胶（对应凝胶中的亮条带）。凝胶碎片的尺寸越小，洗脱效率越高（即回收得到的探针越多）。若担心没将 DNA 全部切下，可再用紫外观察凝胶，确保探针已全部切下来。

同位素标记 DNA

若目的 DNA 条带被 ^{32}P 、 ^{33}P 或 ^{35}S 标记后作为探针，可通过放射自显影很容易观察到。

1. 通过 PAGE 电泳，分离玻璃板，让凝胶附着在较大的玻璃板上，用保鲜膜将凝胶包裹起来。若玻璃板和凝胶与胶片很好地匹配，则应小心取出两个玻璃板后，将凝胶完全用保鲜膜包裹起来（便于操作）。凝胶随时可置于放射自显影胶片上。

2. 将凝胶（夹在玻璃板和保鲜膜之间）贴于胶片，使胶片最贴合凝胶。胶片可简单地与玻璃板一角对齐，玻璃板的四角和侧面直接用永久性标记标记在胶片上，或者也可用放射性油墨定位。胶片的一角（例如右下角）通常被剪掉或折叠起来，这样玻璃板和凝胶在显影后可与胶片对齐。

3. 将凝胶置于自显影胶片，对于高比放射性 ^{32}P 标记的探针约 30 s，对于低比放射性 P 标记的探针或高比放射性的 S 标记的探针约 10 min。目的在于将浅灰色的条带得到曝光，以便可以从凝胶中取出一个很薄的凝胶碎片。用冲洗过的胶片（使用前用指示标记）重新调整玻璃板和凝胶，用无核酸酶的手术刀或刀片小心切除 DNA 条带。凝胶碎片的尺寸越小，洗脱效率越高（即回收探针越多）。凝胶可以重新曝光，以确保凝胶和胶片对齐、探针被切除。

注：若有可能，使用 marker 或已知大小的标准，以便于选择合适的条带。若电泳时没有使用 marker，溴酚蓝（深蓝色）和二甲基苄醇（淡蓝色）染料可作为条带大小参考。不同条件下染料的迁移见附录。

聚丙烯酰胺凝胶 DNA 提取步骤

1. 将凝胶碎片转移至无核酸酶的显微镜载玻片，用另一个玻片（或无核酸酶的刀片）将凝胶捣碎。小心转移凝胶至一个无核酸酶的离心管，加入 **250 μL Gel Elution Buffer**（这些溶液足够淹没一片 2 mm \times 10 mm \times 0.8 mm 的玻片）。对于较大的凝胶，调整 Gel Elution Buffer 的使用量，直至凝胶被覆盖。可使用提供的缓冲液或无菌 ddH₂O 水；然而建议使用提供的洗脱缓冲液，以防外源性核酸酶降解 DNA。

2. 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-4 h。孵育时间取决于凝胶碎片的大小、DNA 片段的大小和孵育的温度。我们发现，约 70% 的 100 bp 的 DNA 片段在 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后可全部溶解。更大的片段需要更长时间来洗脱。

3. 使用蓝色大枪头（尖头部分剪掉一部分）将融化后的凝胶和缓冲液转移至一个无菌的 **1.5 mL Microfuge Tube** 内，10,000 x g 离心 10 min 过滤洗脱下来的 DNA。

注：若分离的标记 DNA 探针用于杂交检测，则无需进一步纯化。洗脱后的探针可直接用于杂交反应。可选苯酚：氯仿萃取。但是，若探针被二氧合酶标记，请勿使用苯酚萃取，否则 DNA 将会被有机相萃取。当然，也可使用标准的乙醇沉淀，伴随（糖原、tRNA 或线性丙酰胺）载体进一步纯化。

使用 Mini Column 纯化 DNA

只有在下游应用需要酶处理 DNA（例如 PCR）时需要进行步骤 **4**，否则，直接使用步骤 **3** 得到的洗脱液即可。

4. 对于步骤 **3** 中的产物，加入 **5 倍体积的 Buffer GC**，简单涡旋

以混匀。对于 <100 bp 的片段，至少加入 **6 倍体积的 Buffer GC**。在这种情况下，加入 5-10 pg 的酵母 tRNA 作为载体将会增加 DNA 回收率。酵母 tRNA 的量不应超过 Buffer GC 使用量的 1/10。

5. 转移 700 μL 上述混合液至 **Mini Column**（自带 **2 mL Collection Tube**），10,000 x g 离心 1 min。弃滤液。

6. 将剩余的混合液转移至 **Mini Column**，按照上述描述离心。弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

7. 加入 **650 μL DNA Wash Buffer**，10,000 x g 离心 1 min，弃滤液，重复步骤 **7**。

注：使用前确保按要求在 DNA Wash Buffer 中加入一定体积的无水乙醇，室温储存。

8. 弃滤液，空离，开盖，最大转速离心 2 min。

注：该步骤有利于去除柱子上残留的乙醇。

9. 将 **Mini Column** 转移至一个无菌的 **1.5 mL Microfuge Tube**，加入 **50 μL Elution Buffer** 或无菌 ddH₂O（或低盐缓冲液），10,000 x g 离心 1 min 洗脱 DNA。对于 <100 bp 的 DNA，一次洗脱可得到约 80% 的 DNA。二次洗脱将会增加洗脱效率。

DNA 在 260 nm 处的紫外吸收定量

寡核苷酸通常以 A₂₆₀ 为单位进行定量，尽管存在争议，但实际的定义是，1 个 A₂₆₀ 代表通过 1 cm 直径的比色皿中测量溶解在 1 mL 缓冲液中寡核苷酸的量，吸光度为 1.0。

1. 将纯化的 DNA 稀释于 ddH₂O 或 TE Buffer，吸光度应在 0.1-0.5 之间。然而，若期望得率 $\leq 5 \mu\text{g}$ ，OD 值会偏低。

2. 在 260 nm 处通过一个干净的 1 cm 比色皿测量吸光度。

3. 计算产物的消光系数 (E) 时, 不考虑低色度效应, 将每个核苷酸的消光系数相加。

Nucleoside	E
dT	8.8 cm ² /pmol
dC	7.3 cm ² /pmol
dG	11.7 cm ² /pmol
dA	15.4 cm ² /pmol

4. 使用朗伯-比尔定律计算样品浓度:

$$A = [E]_{\text{oligo}} \times C \times l$$

A=260 nm 处的吸光度, $[E]_{\text{oligo}}$ =核苷单体消光系数之和, C 指浓度 (pmol), l 代表比色皿直径 (1 cm)。1 μ M 的溶液代表 1 pmol/pl 的溶质。dsDNA 的 E_{oligo} 应加倍。

聚丙烯酰胺凝胶

使用 7 M 尿素, 100 mM Tris-硼酸, 2 mM EDTA 来准备丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 (29:1)。

Final AA concentration	8%	12%	20%
40% acrylamide-bisacrylamide (29:1)	12 mL	18 mL	30 mL
Urea	30 g	30 g	30 g
Distilled water	18.5 mL	12.5 mL	0.5mL
1.0 M Tris-borate (pH 8.3), 20 mM EDTA	6 mL	6 mL	6 mL
10% ammonium persulfate	420 μ L	420 μ L	420 μ L
TEMED	20 μ L	20 μ L	20 μ L

将上述成分混合, 除了过硫酸铵和 TEMED。倒胶前加入过硫酸铵和 TEMED, 60 mL 的溶液足够制 400 mm×200 mm×0.5 mm 的

凝胶。

电泳缓冲液: 100 mM Tris-硼酸, pH8.3; 2 mM EDTA。

从下表选择合适的凝胶浓度:

Gel concentration	Separation range	Bp corresponding to bromophenol blue	Bp corresponding to xylene cyanol
Polyacrylamide (30:1) - ds linear DNA			
3.5%	25-500	100	450
5.0%	15-300	60	270
8.0%	5-200	25	150
Urea-polyacrylamide (19:1) - ss linear DNA			
5.0%		30	125
6.0%		25	110
8.0%		20	75
20.0%		7	27

常见问题解答

问题	可能原因	建议
低得率或没有回收 DNA	Buffer GC 加入量不够	测量洗脱液的体积, 加入 4.5-5 倍的 Buffer GC。对于 < 100 bp 的片段, 可能需要加入更多 Buffer GC。
	没有从凝胶上切下含 DNA 的胶	检查凝胶, 确保 DNA 条带被切下。
	没有从聚丙烯酰胺凝胶上完全洗脱	增加 Elution Buffer 的孵育时间。
	DNA Wash Buffer 使用前忘记加入乙醇	使用前按要求加入一定量的乙醇。
聚丙烯酰胺凝胶过滤装置堵塞	起始材料太小	增加起始样品的量或通过下游实验评估得率
	聚丙烯酰胺凝胶加入 Elution Buffer 之前没有粉碎	用刀片或显微镜切片将凝胶完全切碎。

倍州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA (中国)

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com