

## PAGE 胶 DNA 回收试剂盒（离心柱式）

### HX3048

#### 产品简介

PAGE 胶 DNA 回收试剂盒（离心柱式）是一种基于离心式纯化柱法从 PAGE 胶中快速、便捷、稳定、高效、高质量地回收 DNA 片段的试剂盒。聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）常用于小于 1 kb 的 DNA 片段的分析和分离纯化，又称 PAGE 纯化。PAGE 胶 DNA 电泳的最高分辨率可达 1 bp，因而广泛应用于寡核苷酸分离纯化，特别是引物的分离纯化，也常用于高通量测序时 PCR 扩增产物的纯化。DNA 片段大小会对回收效率产生影响，片段过大或过小，回收效率都会有所降低，DNA 片段大小为 40-100 bp 时，回收效率可达 70% 左右。本试剂盒可用于 20~500 bp 的双链 DNA (dsDNA) 或 20-500 nt 单链 DNA (ssDNA) 从变性或非变性 PAGE 胶中的回收和纯化。采用了一种新型的离子交换柱，在特定条件下，使 DNA 能在离心过柱的瞬间，结合到 DNA 纯化柱上，在一定条件下又能将 DNA 充分洗脱，从而实现 DNA 的快速纯化。含有目标 DNA 的 PAGE 胶经研磨、水浴浸泡渗透至扩散液、高速离心取上清、加入结合液吸附至纯化柱、两次洗涤、洗脱液洗脱等一系列步骤，最终得到高纯度的 DNA 片段回收产物。无需酚氯仿抽提，无需酒精沉淀，通常 12 个样品只需约 20 min 即可完成。纯化所得 DNA 可直接用于酶切、连接、PCR 扩增、测序、杂交等后续实验。

#### 产品应用

基于离心式纯化柱法从 PAGE 胶中快速、便捷、稳定、高效、高质量地回收 DNA 片段，纯化所得 DNA 可直接用于酶切、连接、PCR 扩增、测序、杂交等后续实验。

#### 产品信息

| 组分编号     | 组分名称           | 规格<br>50 T |
|----------|----------------|------------|
| HX3048-1 | Buffer P1（扩散液） | 32 ml      |
| HX3048-2 | Buffer P2（结合液） | 38 ml      |
| HX3048-3 | Buffer WB（洗涤液） | 63 ml      |
| HX3048-4 | Buffer EB（洗脱液） | 5 ml       |
| HX3048-5 | 纯化柱及废液收集管      | 50 套       |
| HX3048-6 | 洗脱管            | 50 个       |
| HX3048-7 | 塑料研磨杵          | 10 个       |

## 储存条件

室温保存，一年有效。

## 注意事项

1. 如果希望获得更高的回收效率，尽可能多地切除不含目标 DNA 的 PAGE 胶。用研磨杵尽可能地把胶条磨碎，以促进后续 DNA 扩散、渗透至溶液中，最终提高回收效率。
2. 试剂盒中的研磨杵需要重复使用。首次使用后，推荐清洗后使用 RNase and DNase Away 处理以确保去除核酸酶，然后再用蒸馏水冲洗后备用。
3. 所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
4. 废液收集管在一次回收中需多次使用，切勿中途丢弃。
5. Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer WB 中含有乙醇，使用后须旋紧瓶盖以防挥发，并须按照易燃试剂的相关规范进行存放和使用。
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

### 1. DNA 变性/非变性 PAGE 电泳与切胶：

- a. 根据所需分离纯化的 DNA 片段大小配制相应浓度 PAGE 胶，以达到最佳的有效分离效果，相关参数如下表所示。

| PAGE (%) | Size (bp) | Xylene Cyanol FF | Bromophenol |
|----------|-----------|------------------|-------------|
| 3.5      | 100-2000  | 460              | 100         |
| 5.0      | 80-500    | 260              | 65          |
| 8.0      | 60-400    | 160              | 45          |
| 12.0     | 40-200    | 70               | 20          |
| 15.0     | 25-150    | 60               | 15          |
| 20.0     | 6-100     | 45               | 12          |

- b. 在 DNA 样品中按比例加入 DNA 上样缓冲液，混匀后上样。

**注：**变性 PAGE 凝胶上样前请反复吹打上样孔，将沉淀的尿素吹出上样孔，以获得更好的电泳效果。

- c. 接通电源，电泳至所需位置。
- d. 取出 PAGE 胶，放置到含有 NA-Red 等核酸染料的无 DNA 酶的水中，在侧摆摇床上缓慢摇动 5-10 min。

- e. 使用一次性手术刀片将含目的 DNA 片段的 PAGE 胶切下, 请确保切下的 PAGE 胶尽可能小并免受其它 DNA 片段的污染。

**2. 凝胶研磨: 用本试剂盒提供的研磨杵在离心管内把 PAGE 胶研磨至细粉末状。**

**3. DNA 扩散:**

- a. 加入 300  $\mu$ l Buffer P1 至 PAGE 胶粉末中, 适当混匀。  
b. 55°C 水浴 60-90 min, 以促进胶中 DNA 扩散到溶液中。

**注:** 对于较大片段的目的 DNA 来说, 可适当延长扩散时间, 甚至 37°C 过夜, 以提高回收效率。孵育过程中可以适当混匀几次, 促进 DNA 的扩散。如果能使用带有震荡或摇动功能的恒温孵育装置效果更佳。

- c. 13,000 g 离心 5 min。  
d. 小心吸取上清到新的离心管中, 尽量避免吸取到凝胶。  
e. 再次加入 300  $\mu$ l Buffer P1 至凝胶粉末中, 55°C 水浴 30-60 min, 适当混匀。

**注:** 累计两次的扩散时间通常约 2 h 或以上就能获得较好的回收效果, 扩散更长时间仅对长度明显偏长的 DNA 片段的回收效率提高有帮助。

- f. 13,000 g 离心 5 min。将上清液再次转移至步骤 3d 相同的上清液收集管中。

**4. 纯化柱吸附:**

- a. 向上清液中加入 700  $\mu$ l Buffer P2, 振荡或吹打混匀, 室温放置 1 min。  
b. 将混合液 (包括沉淀物) 分两次转移至纯化柱内, 每次 13,000 g 离心 30 sec 后倒弃收集管内液体。

**注:** 加入 Buffer P2 后溶液总体积会超过纯化柱的容量 (约 700  $\mu$ l), 因此须分成 2 次过柱, 即将一半的混合物 (约 650-700  $\mu$ l) 加入纯化柱内后 12000 g 离心 30 sec, 倒弃收集管内液体, 再将剩余的混合物加入纯化柱内 12000 g 离心 30 sec, 并倒弃收集管内液体。

**5. 洗涤:**

- a. 加入 600  $\mu$ l Buffer WB, 13,000 g 离心 30 sec, 倒弃收集管内液体。  
b. 重复步骤 5a 一次。

**6. 洗脱:**

- a. 13,000 g 离心 2 min, 充分去除残留液体。  
b. 将 DNA 纯化柱置于本试剂盒提供的洗脱管中, 加入 30-50  $\mu$ l Buffer EB, 室温放置 2-3 min。  
c. 最高速 (约 12,000-16,000 g) 离心 30 sec, 所得溶液即为经 PAGE 纯化的 DNA。

**注:** Buffer EB 需要加到纯化柱柱面中央, 使其被完全吸收。如需获得更高浓度的样品, 可把 Buffer EB 的体积减小至 20  $\mu$ l, 但洗脱下来的总 DNA 量会相对减少。室温较低时, Buffer EB 在 37°C 预热片刻对得率有所帮助。此外, 洗脱后的溶液再次加回到原纯化柱再离心洗脱一次, 可提高得率约 10-30%; 或者在第一

次洗脱后使用新的洗脱液再洗脱一次，会获得约为第一次洗脱量 10-35%的 DNA。