

Code No. 9762

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Agarose
Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 使用前的准备事项	1
● 操作方法	1
● 使用例	3
● 注意事项	3
● Q&A	4

● 制品说明

本试剂盒是从琼脂糖凝胶中回收纯化 DNA 片段的试剂盒。试剂盒采用了特别的凝胶溶解 Buffer，其具有较强的缓冲性能并含有 pH 指示剂，方便判断溶液的 pH 值是否适合与 DNA 制备膜结合，其溶胶能力很强，无需加热，在室温（15–25℃）条件下即可快速溶解凝胶。本试剂盒结合 DNA 制备膜技术，具有高效、快速、方便之特点，全套操作只需 20 分钟便可完成。使用本试剂盒每次可纯化得到多至 20 μg 以上的 DNA 片段（50 bp~20 kb），回收率高达 50~80%，20~50 kb 的 DNA 片段回收率略低。经本试剂盒回收纯化的 DNA 片段纯度高，完整性好，可直接用于连接反应、PCR 扩增、DNA 测序等各种分子生物学实验。

● 制品内容（50 次量）

每次处理的胶块量约为 300 mg（1%凝胶浓度）时，本试剂盒可使用 50 次。

本试剂盒分试剂 Set 与 Column Set 两部分。

■ 试剂 Set

Buffer GM ^{*1}	50 ml
Buffer WB ^{*2}	24 ml
Elution Buffer	2 ml × 2

*1 含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即到医院进行处理。

*2 首次使用前，向 Buffer WB 中添加 56 ml 的 100%乙醇。

■ Column Set

Spin Columns	50 支
Collection tubes	50 支

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 无水乙醇
- ◆ 灭菌水或 Tris-HCl (pH8.0)
- ◆ 3 M 醋酸钠溶液 (pH5.2)

● 保存与运输

1. 本试剂盒可以在室温下（15–25℃）保存。
2. 本试剂盒于室温下（15–25℃）运输。
3. 低温状态下 Buffer GM 可能会出现沉淀，使用前请于 37℃加热至沉淀消失并恢复至室温后使用。

● 使用前的准备事项

1. 首次使用前，向 Buffer WB 中添加 56 ml 的 100%乙醇。
2. 检查 Buffer GM 是否仍为黄色。
3. 试剂中含有变性剂，操作时应佩戴手套等防护用具。

● 操作方法

操作流程见图 1，全套操作约需 20 分钟，详细说明如下。

1. 使用 TAE 缓冲液或 TBE 缓冲液制作琼脂糖凝胶，然后对目的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。
2. 在紫外灯下切出含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面的液体。此时应注意尽量切除不含目的 DNA 部分的凝胶，尽量减小凝胶体积，提高 DNA 回收率。胶块超过 300 mg 时，请使用多个 Column 进行回收，否则严重影响收率。

注) 切胶时请注意不要将 DNA 长时间暴露于紫外灯下，以防止 DNA 损伤。

- 切碎胶块。胶块切碎后可以加快操作步骤 6 的胶块溶解时间，提高 DNA 回收率。
- 称量胶块重量，计算胶块体积。计算胶块体积时，以 $1\text{ mg}=1\ \mu\text{l}$ 进行计算。
- 向胶块中加入胶块溶解液 Buffer GM，Buffer GM 的加量如下表：

凝胶浓度	Buffer GM 使用量
1.0%	3 个凝胶体积量
1.0%~1.5%	4 个凝胶体积量
1.5%~2.0%	5 个凝胶体积量

- 均匀混合后室温 $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 溶解胶块（胶浓度较大或比较难溶时可以在 37°C 加热）。此时应间断振荡混合，使胶块充分溶解（约 $5\text{--}10$ 分钟）。

注）胶块一定要充分溶解，否则将会严重影响 DNA 的回收率。高浓度凝胶可以适当延长溶胶时间。

- 当凝胶完全溶解后，观察溶胶液的颜色，如果溶胶液颜色由黄色变为橙色或粉色，向上述胶块溶液中加入 3 M 醋酸钠溶液 ($\text{pH}5.2$) $10\ \mu\text{l}$ ，均匀混合至溶液恢复黄色。当分离小于 400 bp 的 DNA 片段时，应在此溶液中再加入终浓度为 20% 的异丙醇。

- 将试剂盒中的 Spin Column 安置于 Collection Tube 上。

- 将上述操作步骤 7 的溶液转移至 Spin Column 中， $12,000\text{ rpm}$ 离心 1 分钟，弃滤液。

注）如将滤液再加入 Spin Column 中离心一次，可以提高 DNA 的回收率。

- 将 $700\ \mu\text{l}$ 的 Buffer WB 加入 Spin Column 中，室温 $12,000\text{ rpm}$ 离心 30 秒钟，弃滤液。

注）请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。

- 重复操作步骤 10。

- 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，室温 $12,000\text{ rpm}$ 离心 1 分钟。

- 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上，在 Spin Column 膜的中央处加入 $30\ \mu\text{l}$ 灭菌水或 Elution Buffer，室温静置 1 分钟。

注）将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 60°C 使用时有利于提高洗脱效率。

- 室温 $12,000\text{ rpm}$ 离心 1 分钟洗脱 DNA。

如果实验室备有适合于 Spin Column 接口的负压装置，可从上述操作步骤 7 以后进行以下操作。

- 将试剂盒中的 Spin Column 插到负压装置的插口上。

- 将上述操作步骤 7 的溶液转移到 Spin Column 中，开启调节负压装置，缓慢吸走 Spin Column 中的溶液（流速控制在 1 滴/秒 ）。

- 向 Spin Column 中加入 $700\ \mu\text{l}$ 的 Buffer WB，吸尽 Spin Column 中溶液。

注）请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。

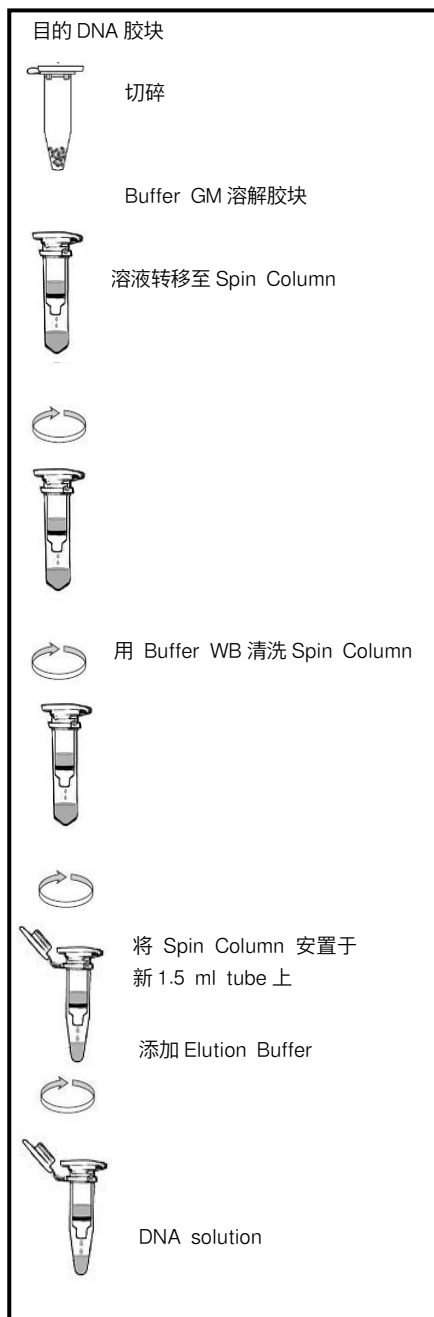


图 1. 操作流程简图

11. 重复操作步骤 10, 然后从负压装置上取下 Spin Column, 将其安置于 Collection Tube 上。
12. 室温 12,000 rpm 离心 1 分钟。
13. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 30 μ l 灭菌水或 Elution Buffer, 室温静置 1 分钟。
注) 将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 60 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。
14. 12,000 rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA。

● 使用例

1. 500 bp、2 kb、5 kb、10 kb 的 PCR 片段起始量分别为 3 μ g、3 μ g、2 μ g、2 μ g 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 使用本试剂盒回收纯化各 DNA 片段, 然后取 1/10 量进行琼脂糖凝胶电泳, 其结果见图 2, 回收率高达 60% 以上。

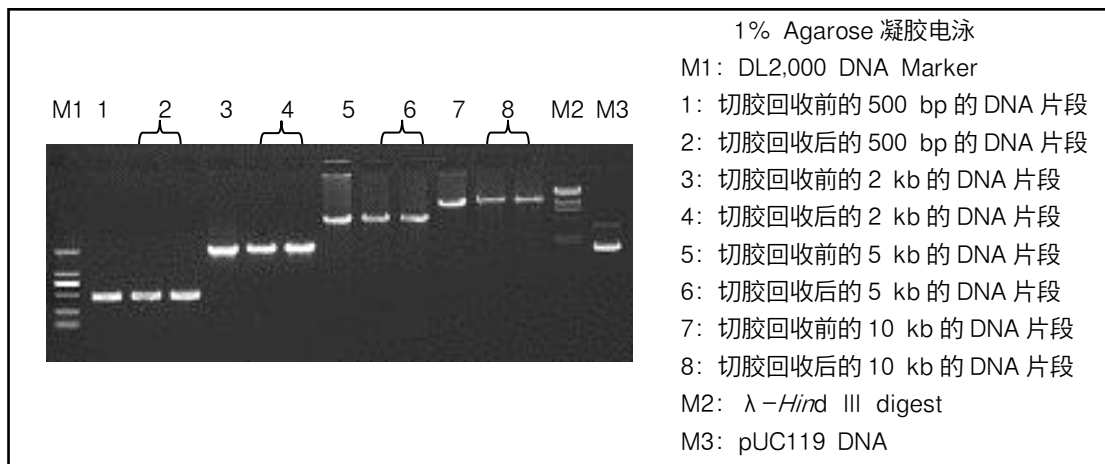


图 2. DNA 片段回收电泳图

2. 18 kb 的 PCR 片段起始量为 4 μ g 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 使用本试剂盒回收纯化 DNA 片段, 然后取 1/10 量进行琼脂糖凝胶电泳, 其结果见图 3, 回收率高达 50% 以上。

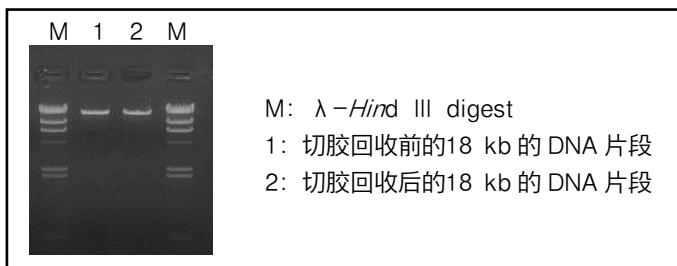


图 3. DNA 片段回收电泳图

● 注意事项

1. 使用前请确认 Buffer WB 中是否加入指定体积的乙醇。
2. 切胶时切忌胶块过大, 应尽量减小凝胶体积, 否则会影响 DNA 收量。
3. DNA 需长期保存时, 建议在 Elution Buffer 中保存。
4. 纯化的 DNA 用于 DNA 序列分析时, 最好使用灭菌水洗脱 DNA。

● Q&A

Q1. 回收 DNA 时，一般使用多少洗脱液洗脱？

A1. 可以根据所需浓度计算使用洗脱液的体积，一般情况下，洗脱液体积大于 30 μl 即可洗脱 Column 上 90% 以上的 DNA（但要注意洗脱液需直接加至膜中央），所以洗脱液体积最好大于 30 μl ，当对 DNA 浓度要求较高时，也可以适当减少洗脱液体积至 20 μl ，但回收率会略有下降，应注意使用预热的洗脱液洗脱，并在洗脱离心之前静置 1 分钟以上，以提高洗脱效率。

Q2. 本试剂盒一次可以回收的 DNA 量的范围是多少？

A2. 本试剂盒中 Column 一次回收的最大吸附量可达 20 μg 以上，最小 DNA 起始量也可低至 500 ng，所以使用前请对 DNA 样品的总量进行估算。

Q3. DNA 的收量较低，为什么？

A3. 一般情况下，DNA 的回收率可以达到 50–80%。DNA 收量较低时，可以从以下几个方面考虑：

- ① 胶块体积过大，单个 Column 可以承载的凝胶体积最好小于 300 mg，大于 300 mg 的凝胶，请使用多个 Column 进行回收，否则收率较低。
- ② 使用请确认 Buffer WB 中是否加入了指定体积的乙醇。
- ③ 溶胶未完全。溶胶时注意观察胶块是否完全溶解，胶块未完全溶解会严重影响收量。溶胶时，间断颠倒混匀溶胶液有助于胶块的快速溶解。
- ④ 溶胶液 pH 值过高。溶胶后注意观察溶胶液颜色，若溶胶液的颜色由黄色变为橙色或粉色表明溶胶液的 pH 值过高，会造成 DNA 收量较低，此时应向溶胶液中加入 3 M 醋酸钠 (pH5.2) 10 μl ，混合后至溶胶液颜色变回黄色时，再将溶胶液转移至 Column 上进行后续操作。
- ⑤ 使用离心方法时，注意要在常温下离心，使 DNA 更好地和 Column 上的膜结合。
- ⑥ 洗脱前的空离步骤不可省略，此步骤可以除去 Column 上残留的洗液中的乙醇，否则影响洗脱效率。
- ⑦ 洗脱时将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 60°C 后使用有利于提高洗脱效率。

Q4. 长片段 DNA 回收时应该注意哪些问题？

A4. 当 DNA 片段长度较长（10 kb 以上）时，回收效率会有所下降，这是 DNA 切胶回收时的常见现象。此时建议按以下方法解决问题：

- ① 适当增加待回收 DNA 样品的添加量（如起始量加至 2~5 μg ）。
- ② 由于长片段 DNA 不易从滤膜上洗脱下来，建议使用加热至 60°C 的 Elution Buffer 洗脱 DNA，可以提高回收效率。
- ③ 减少操作过程中对长片段 DNA 的物理损伤：如振荡混合操作不要过于剧烈，切胶时不要将 DNA 长时间暴露于紫外灯下，在进行电泳时可以使用 6 × Quadricolor-loading Buffer (Code No. 9171) 判断核酸的迁移情况，避免使用紫外灯反复照射观察核酸迁移情况。

Q5. 回收得到的 DNA 反应性能不佳（酶切、连接），为什么？

- A5. ① 洗脱液中残留部分盐离子，加入 Buffer WB 后室温静置 5 分钟，有助于彻底清洗掉 Column 上残留的盐离子。
- ② 洗脱液中残留乙醇，在向 Column 中加入洗脱液之前，将 Column 在室温下静置 2 分钟有助于使 Column 上残留的乙醇彻底挥发，然后再加入洗脱液洗脱。
- ③ 进行 DNA 洗脱时用灭菌水或 Elution Buffer 洗脱。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201811Da