

DNA 的胶回收 (柱纯化)

DNA 的胶回收是实验室分子实验的常规操作, 本 Protocol 使用聚合美的胶回收试剂盒 M5 Gel Extraction Kit (with column)

1. 切胶: 用干净刀片将目的 DNA 条带切下, 尽量不要多切, 放入 1.5 mL 塑料离心管中
 - ! 紫外线对 DNA 片段有损坏作用, 切胶要迅速, 避免长时间照射, 同时做好眼睛及皮肤的防护
2. 溶胶: 加入 500 μ L 膜结合液(MB) (胶块约 0.5 g), 60°C金属浴, 每隔 2~3 min 上下振荡, 直到凝胶完全溶解
 - ! 也可以用该试剂盒直接纯化 PCR 产物, 加入 PCR 产物体积的 3-5 倍膜结合液混匀即可
 - ! 回收<300 bp 的小片段或者>3000bp 的大片段, **必须** 在凝胶完全溶解后再加入 1/2 胶块体积的异丙醇以提高回收率
3. 柱平衡: 向吸附柱中 (吸附柱放入收集管中)加入 400 μ L 的平衡液 BL, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心 1 min, 弃收集管中滤液, 将吸附柱重新放回收集管中
4. 吸附: 待溶液 **冷却** 后加入离心吸附柱中, 室温静置 2 min, 让 DNA 片段与吸附柱中的硅胶膜充分结合, 然后 12,000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中滤液
 - ! 如总体积超过 750 μ L 可分 2 次将溶液加入同一离心吸附柱中
 - ! 为增加目的 DNA 片段的洗脱浓度, 也可将多管溶胶液加入到同一离心吸附柱中
5. 清洗: 加入 600 μ L 的膜漂洗液(MW), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中废液。
 - ! 膜漂洗液(MW)按要求加入乙醇, 用后应立即盖紧瓶盖, 以防酒精挥发
 - ! 如后续实验要求纯度较高, 可再清洗一次
6. 干燥: 将离心吸附柱于 12,000 rpm 离心 2 min, 甩干残留漂洗液
7. 洗脱: 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 mL 塑料离心管中, 在吸附柱中央加入 30~50 μ L 灭菌水, 室温放置 2 min。12,000rpm 离心 1 min 收集 DNA 片段
 - ! 为增加回收效率, 可将灭菌水在 60°C预热
 - ! 若浓度不理想, 可将得到的溶液重新加入到离心管中, 室温放置 2 min, 再次离心收集
8. 测量浓度, -20°C保存

修订日期 2024-04-23