

# D2561 Poly-Gel DNA Extraction Kit

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释 SPW Wash Buffer.

➤ 使用【无水乙醇】对 SPW Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存。

货号	加入量
D2561-00	8mL
D2561-01	20mL
D2561-02	40mL

### PAGE 方法

丙烯酰胺凝胶可用于分离小片段的 DNA，通常可针对 < 100bp 的片段。该凝胶的丙烯酰胺含量较低 (≤6%)，且含有非离子变性剂尿素 (7M)，对于凝胶成分和缓冲液的更多特殊要求，可参阅英文说明书附录部分。

### DNA 的显现

#### 荧光阴影

通过用 UV 胶紫外照射的方法，可在聚丙烯酰胺凝胶上分辨 DNA 片段，与染色法相比，该方法更加直接，且产率更高（可参考下面的 DNA 染色）。在该技术的使用中，凝胶放置在荧光材料的顶部，即荧光 TLC 硅胶板，然后用 UV 光源照射凝胶，凝胶中的 DNA 条带将阻挡 UV 光向基底透射，即在基底形成暗区（也就是不发荧光的区域）。

1. 从玻璃板上取下凝胶（玻璃阻挡紫外线，并防止紫外线遮蔽或染色），并用塑料包装起来以做好标记并做实验。取下顶部玻璃板后，在凝胶上铺一层保鲜膜，将凝胶和玻璃板翻转，小心将凝胶从底部玻璃板上剥离，用塑料包装将凝胶完全包裹起来；

TIP：只需使用单层保鲜膜，并尽可能防止凝胶和塑料包装之间形成气泡。这些气泡会散射紫外线导致更难观察。

2. 将凝胶放到涂有氟涂层的 TLC 板（Ambion, 10110 或 Merck 60F254）的暗白侧面上，并将凝胶顶部的塑料包装取下。在凝胶上保持手持短波长（254nm）UV 光源。（长波紫外线不起作用）。如果存在核酸，凝胶下方的 TLC 板会发出明亮的紫色光，DNA 条带将显示为暗影，单个波段的灵敏度极限为 0.3μg。

TIP：紫外线阴影适合用于标记或未标记的 DNA 或 RNA，因此该技术在很多实验中都有应用，如：用于可视化限制酶消化。

#### DNA 染色：

作为 UV 胶紫外照射的替代方案，丙烯酰胺凝胶可用吖啶橙或溴化乙锭 (EtBr) 染

色，并在 UV 透射仪上，将凝胶内的 DNA 条带位置显现出来。

如果将 DNA 作为探针，注意需要在杂交之前将杂质完全除去，或者会影响到杂交效率。我们建议使用吖啶橙（不建议使用 EtBr），因为该试剂盒使用 HiBind® DNA spin column 进行纯化，将探针 DNA 中的吖啶橙除去。（也可使用 EtBr，但需要多进行一次丁醇提取，再将样品转移到 HiBind® DNA spin column 中将其除去。）

1. 按照 UV 紫外光照射的方法，先将凝胶从玻璃板上取下；
2. 将凝胶从塑料包装中取出，置于 2.0µg/mL 吖啶橙溶液中，浸泡 15min，再将凝胶取出至蒸馏水中浸泡 10min，将凝胶重新包裹回到塑料包装中以便于实验，将凝胶放在 UV 透射仪上，DNA 显现。
3. （使用无核酸酶的实验刀或刀片）小心将可能包含 DNA 条带的凝胶片段切下（对应于凝胶中的亮条带，尽可能取出多余的胶）。将越多多余的凝胶切除，最终的回收效率就越高（即可更快地回收到更多的 DNA），如果担心有非目的条带没有切除，可再次将凝胶转移到紫外光下进行观察。

### 同位素标记的 DNA

如果目的 DNA 条带已经用  $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、或  $^{35}\text{S}$  标记用作探针，则可通过放射自显影使 DNA 显现。

1. 在 PAGE 之后，将胶从玻璃板上取下，使其粘附到更大的玻璃板上。在凝胶上包裹一层保鲜膜。将凝胶转移到胶片盒中。如果玻璃和凝胶不能装入胶片盒，需将两块玻璃板小心取下，将凝胶完全用塑料包装包起来（以便于实验）。
2. 将凝胶（夹在玻璃和塑料包装之间）放在薄膜上，使薄膜与凝胶最接近，将薄膜与玻璃板的一个角对齐，玻璃板的角和侧面用永久性标记笔直接标记到薄膜上，另外，也可使用 radioactive 墨水进行定向。薄膜的一个角（如右下角）通常被剪断或折叠，使得玻璃和凝胶在显影后可与薄膜对齐。
3. 将凝胶暴露在放射自显影胶片，对于高比活性  $^{32}\text{P}$  标记的探针约需要 30s，对于低比活性  $^{32}\text{P}$  标记的探针或高比活性  $^{35}\text{S}$  标记的探针需要 10min。目的是曝光获得浅灰色的条带，以便可以从凝胶上切下薄的凝胶片段。将玻璃板和凝胶与显影的胶片重新对准（使用之前制作的引导标记），用无核酸酶的实验刀或刀片小心地将条带切下。将多余的凝胶片段去除得越少，实验提取产率越高，探测恢复得更快。可将凝胶重新曝光观察以确保凝胶和薄膜对齐且切下的片段中包含所需探针片段。

TIP：如果已知片段大小或作出标记，可帮助选择适当的波段；如果没有，则需使用溴酚（深蓝色）和二甲苯蓝（浅蓝色）染料作为参考，有关不同条件下染料迁移的情况，可参考英文说明书附录。

### 凝胶 DNA 提取:

1. 将凝胶片段转移到无核酸酶的显微镜载玻片上, 使用另一个载玻片 (或无核酸酶的刀片) 捣碎凝胶, 形成浆液。小心将凝胶浆液转移到无核酸酶的微量离心管中, 加入 250 $\mu$ l Poly-Get DNA Elution Buffer, 该用量通常能浸没 2mm $\times$ 10mm $\times$ 0.8mm 的切片。对于较大的片段, 可调节 Poly-Get DNA Elution Buffer 的用量至将凝胶完全浸没。也可使用其他缓冲液或 dH<sub>2</sub>O, 但建议使用 Poly-Gel DNA Elution Buffer, 可防止外源核酸酶对 DNA 的降解。
2. 将浸没了 Poly-Get DNA Elution Buffer 的凝胶片段放置在 65 $^{\circ}$ C 孵育 1-4h, 孵育时间取决于凝胶块的大小、DNA 片段的大小和孵育的温度。对于 100bp 大小的 DNA 片段, 在 65 $^{\circ}$ C 孵育 4h 后, 洗脱效率约在 70% 左右, 对于较大的片段, 则需要更长时间孵育。
3. 将 Poly-Gel Filter Unit 套入到 2mL 收集管中, 转移凝胶缓冲液到过滤器中, 室温下 10,000xg 离心 10min 过滤洗脱的 DNA, 收集滤液;

Note: 如果分离标记的 DNA 探针用于杂交测定, 则无需进一步纯化, 等分试样的洗脱探针可直接用于杂交反应。可选苯酚: 氯仿萃取。然而, 如果是用 digoxigenin 探针标记的 DNA, 则不能用苯酚萃取, 因为 DNA 会被分离到有机相中。此外, 可以进行含有载体 (糖原、tRNA 或线性丙烯酰胺) 的标准乙醇沉淀以进一步净化。

### 使用 HiBind<sup>®</sup> Columns 纯化 DNA

只有当下游实验需要酶参加反应时 (如 PCR 等), 才需要按照以下方法进行纯化, 可直接对步骤 3 中获得的产物进行纯化。

4. 向步骤 3 中的洗脱液中加入 5 倍体积的 Buffer HB, 并短暂涡旋混匀。对于小于 100bp 的片段, 则需要加入 6 倍体积的 Buffer HB, 可加入 5-10 $\mu$ g 的酵母 tRNA 作为载体来提高回收到 DNA 的产量。载体 tRNA 的用量不应该超过 Buffer HB 的 1/10 倍体积。
5. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA column 套入到 2mL 收集管中, 转移 750 $\mu$ l 上述混合液至柱子中, 室温下 10,000xg 离心 1min, 弃滤液;
6. 重复步骤 5, 直至将所有混合液转移过柱;
7. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA column 套回到 2mL 收集管中, 加入 700 $\mu$ l SPW Wash Buffer, 室温下 10,000xg 离心 1min, 弃滤液;

Note: SPW Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

8. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA column 套回到 2mL 收集管中, 10,000xg 离心 2min 干燥柱子;

Note: 该步骤对于除去残留的乙醇至关重要。

9. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA column 套入到 1.5mL 离心管中, 加入 15-30 $\mu$ l 无菌 dH<sub>2</sub>O (或

低盐缓冲液) 至柱子基质, 10,000xg 离心 1min 将 DNA 洗脱。对于 < 100bp 的 DNA, 一次洗脱柱子中大约 80% 的 DNA。如果预期产量大于 20 $\mu$ g, 可另加入 15-30 $\mu$ l 水进行重复洗脱。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准