

# 操作手册

## DNA回收纯化试剂盒-5 (96孔板)

Catalog No. TD4023/TD4024

### 【Highlights】

- ◆ 从PCR、酶反应和其他来源快速、高通量地回收超纯DNA。
- ◆ DNA可以在只有10  $\mu$ l的情况下被洗脱，非常适合DNA连接、测序、标记、PCR、微阵列、转染、转化、限制性消化等应用。

Ver.0.0.1

## 【产品组分】

试剂盒组成	TD4023 (2 x 96 次)	TD4024 (4 x 96 次)	保存
DNA 结合液	100 ml	2x100 ml	室温
DNA 洗涤液	24 ml	48 ml	室温
DNA 洗脱液	10 ml	16 ml	室温
1号柱板 (96孔深孔板)	2	4	室温
收集板	2	4	室温
洗脱板	2	4	室温
说明书	1	4	-

DNA洗涤液标签上指示使用前必须加入乙醇。

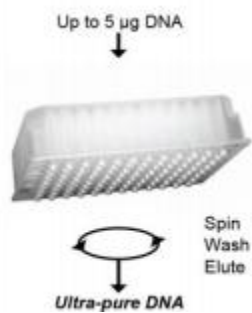
## 【产品特性】

- ◆ DNA 纯度：高质量的 DNA ( $A_{260/280} \geq 1.8$ )，非常适合连接、测序、标记、PCR、微阵列、转染、转化和限制性消化等程序。
- ◆ DNA 大小限制：从约 50 bp 到 23 kb。
- ◆ DNA 回收：通常每个孔最多可洗脱 5  $\mu\text{g}$  总 DNA 至少量的 10  $\mu\text{l}$  低盐 DNA 洗脱液或水中。对于 50 bp 到 10 kb 的 DNA，回收率为 70-90%。对于 11 kb 到 23 kb 的 DNA，回收率为 50-70%。
- ◆ 样品来源：来自酶反应（例如 PCR、限制性核酸内切酶消化）、质粒制备和不纯净制备的 DNA。适用于存储在 DNA/RNA 保护剂中的分离 DNA（第 7 页）。
- ◆ 产品对洗涤剂的耐受性： $\leq 5\%$  Triton X-100、 $\leq 5\%$  Tween-20、 $\leq 5\%$  Sarkosyl、 $\leq 0.1\%$  SDS。

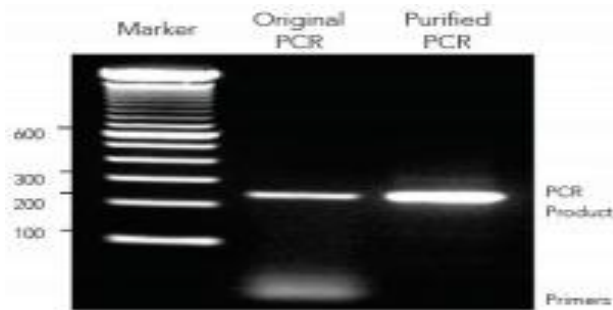
## 【产品描述】

DNA 回收纯化试剂盒-5 提供了一种方便快捷的方法，用于从 PCR、核酸酶消化、细胞裂解液和其他不纯净的 DNA 制备中快速、高通量地纯化和浓缩高质量的 DNA。它还可用于 RT 后 cDNA 清理和从 M13 噬菌体中纯化出测序就绪的 DNA。只需将专门配制的 DNA 结合液加入样品中，然后转移到提供的 1 号柱板（96 孔深孔板）的孔中。无需有机变性剂或氯仿。相反，该产品采用了快速旋转技

术，在短短几分钟内产生不含盐和污染物的 DNA。使用 96 DCC®-5 纯化的 DNA 适用于核苷酸测序、微阵列分析、PCR 和限制性核酸酶消化程序。

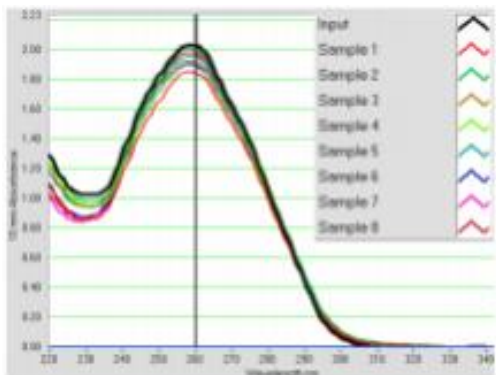


96 DCC®-5 procedure.



干净且浓缩的 DNA。

如此处所示的 PCR 产物等 DNA 样品可以通过 DNA 回收纯化试剂盒-5 进行高效纯化和浓缩。



PDCC®-5 提供纯净可靠的回收。此处显示的是将 1 µg 的 100 bp 标记 DNA 洗脱至 10 µl 水，并使用 NanoDrop®分光光度计进行分析的回收情况。DNA Clean & Concentrator® -5 一致地回收 > 90% 的输入 DNA。

**【格式】**

	DCC™-5	DCC™-25	DCC™-100	DCC™-500	Genomic DCC™	96 DCC™-5
Capacity	5 µg/ prep.	25 µg/ prep.	100 µg/ prep.	500 µg/ prep.	10 µg/ prep.	5 µg/ prep.
Elution Vol.	≥ 6 µl	≥ 25 µl	≥ 150 µl	≥ 2 ml	≥ 10 µl	≥ 10 µl

## 【应用】

PCR后DNA清洗	高效去盐DNA，去除DNA聚合酶、引物和游离dNTPs。
酶反应中的DNA清洗	DNA 高效去盐，去除修饰酶、RNA聚合酶、连接酶、激酶、核酸酶、磷酸酶、核酸内切酶等。
反转录后（RT）和cDNA清洗	高效地在RT后纯化DNA，可以是DNA/RNA复合物，也可以是在RNA模板的化学水解后形成的单链cDNA。
质粒DNA清洗	高效地从“自制”的细胞裂解液或商业试剂盒中纯化质粒DNA。使用DCC®纯化和浓缩的质粒DNA已被证明是优质DNA测序的优良底物。
同位素和染料去除	高效去除体外标记反应后DNA中未结合的荧光（例如，AMCA、FITC、BIO、DIG、Cy3、Cy5、FAM等）和放射性标记的dNTP衍生物。
M13单链DNA的纯化	DCC®可用于直接从噬菌体感染的大肠杆菌培养上清液中快速分离单链M13噬菌体DNA。

- ✓ 对于纯化长度  $\geq 16$  nt 的短 DNA 或 RNA 寡核苷酸，请使用 Oligo Clean & Concentrator™ (TD4060、TD4061)。
- ✓ 对于 ChIP（染色质免疫沉淀）样品清理，请使用 ChIP DNA Clean & Concentrator® (TD5201、TD5205) 从标准 ChIP 协议中的任何步骤获得高质量的 DNA。
- ✓ 对于循环测序样品，请使用 Sequencing DNA Clean-up Kit™ (TD4050、TD4051) 进行染料斑点消除。
- ✓ 对于含有 PCR 抑制剂的样品，请使用 OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (TD6030、TD6035)。

## 【溶液制备】

- ✓ 开始之前：将 96 毫升 100%乙醇（104 毫升 95%乙醇）加入 24 毫升 DNA 洗涤液浓缩液中。将 192 毫升 100%乙醇（208 毫升 95%乙醇）加入 48 毫升 DNA 洗涤液浓缩液中。

## 样品处理

所有离心步骤应在 3,000 - 5,000 x g 之间进行。

1. 向每卷 DNA 样品加入 2-7 倍体积的 DNA 结合液（见下表）。轻轻振荡混合。

应用	DNA结合液：样品	示例
P质粒、基因组DNA (>2 kb) <sup>2</sup>	2 : 1	200 $\mu$ l : 100 $\mu$ l
PCR 产物, DNA 片段	5 : 1	500 $\mu$ l : 100 $\mu$ l
ssDNA3 (例如cDNA、M13噬菌体)	7 : 1	700 $\mu$ l : 100 $\mu$ l

2. 将样品混合物转移到安装在收集板上的 1 号柱板（96 孔深孔板）的孔中。
3. 离心 5 分钟，直到完全过滤样品混合物。丢弃流通过的液体。
4. 向 1 号柱板（96 孔深孔板）的每个孔中加入 300  $\mu$ l DNA 洗涤液。离心 5 分钟。重复洗涤步骤，但离心 15 分钟。（或者，可以使用 600  $\mu$ l DNA 洗涤液进行一次洗涤）。
5. 向每个孔的柱状基质中直接加入  $\geq 10$   $\mu$ l DNA 洗脱液或水。将 1 号柱板（96 孔深孔板）转移到洗脱板上，离心 3 分钟以洗脱 DNA。超纯 DNA 现已准备就绪。

注：

1. 对所有  $\leq 50$   $\mu$ l 的样品至少添加 100  $\mu$ l DNA 结合液。
2. 为了高效回收 >20 kb 的 DNA，请使用 DNA 回收纯化试剂盒-5（96 孔板）（TD4066, TD4067）。
3. 对于 ssDNA 纯化，请参阅附录 A，第 5 页。
4. 1 号柱板（96 孔深孔板）每个孔的容量约为 1.1 ml。收集板每个孔的容量约为 800  $\mu$ l。因此，如果样品体积大于 800  $\mu$ l，可能需要多次加载和离心板。
5. DNA 洗脱液：10mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1mM EDTA。
6. 从柱中洗脱 DNA 取决于 pH 和温度。如果使用水，请确保 pH > 6.0。在洗脱之前等待 1 分钟可能会提高较大 (> 6 kb) DNA 的产量。对于更大的 DNA (> 10 kb)，可以使用 60-70°C 的 DNA 洗脱液提高总产量。

## 【附录】

### cDNA 清洗

DCC®套件可有效清洗和浓缩反转录（RT）后的 cDNA (> 500 nt)，无论是否存在荧光染料。使用 DCC®可以有效去除未结合的游离核苷酸和荧光衍生物，并且回收的 cDNA 可以直接用于微阵列分析、第二链 cDNA 合成或间接使用 NHS 酯 Cy3 或 Cy5 等荧光染料标记。

对于清除短 cDNA 或 ESTs ( $\geq 16$  nt)，我们建议使用 Oligo Clean & Concentrator (货号 TD4060、TD4061)。

### 水解

1. 向 50  $\mu$ l RT 反应中加入 10  $\mu$ l 0.5 M EDTA 和 10  $\mu$ l 1 N NaOH。根据 RT 反应的起始体积，EDTA 和 NaOH 的体积应按比例缩放。
2. 在 65°C 孵育 15 分钟。

### 清洗

1. 向上述水解反应中加入 490  $\mu$ l (7 倍体积) 的 DNA 结合液。混匀。RNA 水解后，中和 (pH) 不是必要的，因为 DNA 结合液将有效中和加入反应中的 NaOH。
2. 继续执行第 5 页的样品处理协议的第 2 步。

### M13 噬菌体 SSDNA 纯化

1. 将噬菌体感染的细菌培养物以 8,000 x g 离心 1 分钟。
2. 将含噬菌体的上清液中的 100  $\mu$ l 转移到 1.5 ml 微量离心管中，并加入 700  $\mu$ l (7 倍体积) 的 DNA 结合液。轻轻振荡混合。如果上清液体积增加，可以通过相应增加加入样品的 DNA 结合液的数量来处理。
3. 继续执行第 5 页的样品处理协议的第 2 步。

### RNase A 处理

将 RNase A (TE1008-30)，单独销售，溶解在 DNase/RNase-free 水或 TE 中，制备 10 mg/ml 的储备液。

1. 向样品中加入足够的 10 mg/ml RNase A，使最终浓度为 10-100  $\mu$ g/mL，并充分混合。
2. 室温孵育 15 分钟。
3. 继续执行第 5 页的样品处理协议的第 1 步。

注：

使用 DNA/RNA 保护剂将样品体积调整至 50  $\mu$ l (最小值)。

## 【故障处理】

问题	可能的原因和建议的解决方案
低回收率	不正确准备/存储的DNA洗涤液。确保已向DNA洗涤液浓缩液中加入乙醇。紧密盖上瓶盖，防止随时间的蒸发。
	加入DNA洗脱液。将洗脱液直接加入到柱状基质中，而不是加入到柱壁上。对于大于或等于10 kb的大DNA，洗脱液需要与基质接触至少1分钟。
	不完全洗脱。DNA的洗脱取决于pH值、温度和时间。对于大的基因组DNA (≥50 kb)，在洗脱之前将加热的洗脱液 (60-70°C) 应用到柱子上，并孵育几分钟。可以进行连续的洗脱以获得定量更高的回收率，但最终DNA浓度较低。这适用于大于或等于10 kb的DNA。
低A260/A230比率	柱顶受到污染。在从收集管中取出柱子时，要小心柱子的顶端不要接触流出液。流出液中微量的盐可能会污染样品，导致A260/A230比率低。流出液中的乙醇污染也可能影响DNA的洗脱。柱设计为完全洗脱，无液残留或带入。
使用DCC®进行清洗后，在琼脂糖凝胶中出现多个条带。	DNA加载染料的酸化。大多数加载染料不含EDTA，并且随着时间的推移会因为一些微生物的生长而酸化 (pH ≤ 4)。这种低pH足以导致DNA降解。因此，如果水被用于洗脱DNA，则建议使用含有1 mM EDTA的6X加载染料。

## 【订购信息】

产品	货号	规格
DNA回收纯化试剂盒 (用于每次准备纯化高达5 µg的DNA)	TD4003T (uncapped)	10 Preps.
	TD4003 (uncapped)	50 Preps.
	TD4004 (uncapped)	200 Preps.
	TD4013 (capped)	50 Preps.
	TD4014 (capped)	200 Preps.
DNA回收纯化试剂盒-5 (96孔板) (96孔板纯化, 每孔最多可纯化5 µg DNA)	TD4023	2 x 96 Preps.
	TD4024	4 x 96 Preps.
DNA回收纯化试剂盒-25 (用于每次准备最多可纯化25 µg DNA)	TD4005 (uncapped)	50 Preps.
	TD4006 (uncapped)	200 Preps.
	TD4033 (capped)	50 Preps.
	TD4034 (capped)	200 Preps.
DNA回收纯化试剂盒-100 (用于每次准备最多可纯化100 µg DNA)	TD4029	25 Preps.
	TD4030	50 Preps.
DNA回收纯化试剂盒-500 (用于每次准备最多可纯化500 µg DNA)	TD4031	10 Preps.
	TD4032	20 Preps.
单独组件	货号	规格
DNA结合液	TD4003-1-50	50 ml
	TD4004-1-100	100 ml
DNA洗涤液	TD4003-2-24	24 ml
	TD4003-2-48	48 ml
DNA洗脱液	TD3004-4-10	10 ml
	TD3004-4-16	16 ml
1号柱板 (96孔深孔板)	TC2004	2 Plates
收集板	TC2002	2 Plates
洗脱板	TC2003	2 Plates