**实验五 目的片段回收**

**一、实验目的**

DNA分子经限制性内切酶消化以后，产生较小的片段，我们须从中选出我们需要的片段（目的片段），进一步作亚克隆，或用作探针。通过本实验，我们将学习掌握从琼脂糖凝胶电泳中回收DNA片段的一种方法。

**二、实验原理**

回收目的片段的方法有多种，常用的有冻融法、低熔点琼脂糖法、透析袋法、电泳回收法、玻璃孔回收法等。本实验采用电泳回收法。通过特别的V形电泳槽，将挖出的含有目的片段的凝胶置于V形槽前，接通电泳电源，DNA即进入V形管中，回收V形管中溶液即可，V形管较小，回收的DNA片段能保持较高的浓度。

**三、实验材料及仪器用具**

1. 实验材料

酶切后的DNA片段

2. 实验试剂

0.8%琼脂糖、10×TBE电泳缓冲液、7 M醋酸铵、载样缓冲液

3. 实验仪器

电泳仪、电泳槽、V形管回收电泳槽、紫外透射检测仪、微量取液器、吸管头若干、刀片、微量离心管、扁头镊子

**四、实验步骤**

1. 大量酶切产物的电泳分离。

 琼脂糖为0.8％，选用大型电泳槽及厚梳子，并在低电压下电泳以提高分辨率。

2. 紫外灯下用刀片小心切出含1000bpDNA片段的凝胶。

3. 把凝胶片置于特制的“V”型槽平台上，在“V”型槽中加入0.5×TBE电泳缓冲液(使其刚好淹过胶面)，再在“V”型孔中加入7 M NH4Ac，接通电源进行电泳。

4. 紫外灯下检测凝胶块是否含有DNA，判断DNA是否全部进入V形管溶液中。

5. 当DNA进入V形管中，放掉电泳槽中的缓冲液，吸出V形管中的溶液。

6. 溶液加两倍体积的无水酒精，混匀，置-70oC两小时或-20oC过夜。

7. 12000 rpm离心10分钟，沉淀用70％酒精洗一次，风干，加入10 µl TE。取1 µl与8 µl TE及1µl载样缓冲液混合，电泳检查并根据带的亮度估算其浓度。

**五、注意事项**

挖含目的DNA的凝胶时，尽量减少周围凝胶的带入。