

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	PS2442
产品名称:	多功能 DNA 纯化回收试剂盒

产品简介:

在高离子盐存在的情况下，DNA 片段选择性的吸附于离心柱内的硅基质膜上，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，漂洗液将引物、核苷酸、蛋白、酶等杂质去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净 DNA 从硅基质膜上洗脱。本产品适用于 PCR 反应产物、酶切产物 DNA 片段、探针标记纯化回收，DNA 样品浓缩等。

产品特点:

1: 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2: 使用了优质结合液，不含传统溶胶液的碘化钠和高氯酸盐，不抑制回收后酶切、连接克隆等下游反应。
3: 结合液加酚红调制成为了黄颜色，便于观察溶胶效果和监测 pH 值变化从而达到最佳结合效果，大大提高回收效率。
4: 改进的结合液配方，大大提高了缓冲能力和稳定性，即使样品变化很大也能将 pH 缓冲在最佳结合范围内。
5: 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
6: 独特的溶胶液/结合液配方，将溶胶和结合两种功能统一，因此一个试剂盒可以运用于琼脂糖 DNA 回收、PCR 产物清洁纯化、酶切产物纯化回收等多种情况，节省了需购买多种试剂盒的费用。

组分:

组分	组分名称	包装规格 (100T)	储存
组分 A	平衡液	10mL	室温
组分 B	溶胶/结合液 DB	60mL	室温
组分 C	漂洗液 WB	25mL, 第一次使用前请加入 100mL 乙醇。	室温
组分 D	洗脱缓冲液 EB	10mL	室温
组分 E	吸附柱 EC	100EA	室温
组分 F	收集管 (2mL)	100EA	室温

操作步骤:

第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入 100mL 无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入。

一: 琼脂糖凝胶 DNA 回收

1: 在长波紫外灯下，用干净刀片将所需回收的 DNA 条带切下，尽量切除不含 DNA 的凝胶，得到凝胶体积越小越好。

2: 将切下的含有 DNA 条带凝胶放入 1.5 mL 离心管，称重。

注意: 先称一个空 1.5 mL 离心管重量，然后放入凝胶块后再称一次，两次重量相减，得到凝胶的重量。

3: 加 3 倍体积溶胶/结合液 DB。

注意: 如果凝胶重为 100 mg，其体积可视为 100 μ L，则加入 300 μ L 溶胶液。如果凝胶浓度大于 2%，应加入 6 倍体积溶胶液。

4: 56°C 水浴放置 10 分钟（或直至胶完全溶解）。每 2-3 分钟涡旋震荡一次帮助加速溶解。





5: 可选, 一般不需要: 每 100 mg 最初的凝胶重量加入 150 μ L 的异丙醇, 震荡混匀。 注意: 有时候加入异丙醇可以提高回收率, 加入后不要离心。回收大于 4Kb 的片段时, 不加入异丙醇, 加入有时反而可能降低回收效率。
6: 平衡液预处理吸附柱: 使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤, 具体方法参见文末“关于平衡液的使用”。
7: 将上一步所得溶液加入吸附柱 EC 中(吸附柱放入收集管中), 室温放置 1 分钟, 12,000rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。 注意: 如果总体积超过 750 μ L, 可分两次将溶液加入同一个吸附柱 EC 中。过滤下的溶胶/结合液和收集管内残存的强碱性平衡液混合后, 溶胶液可能会从黄色变成橘红甚至紫色, 此为酚红 PH 指示剂碱性条件下的正常颜色变化。
8: 加入 600 μ L 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
9: 加入 600 μ L 漂洗液 WB, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
10: 将吸附柱 EC 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11: 取出吸附柱 EC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 50 μ L 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量 DNA, 可将得到的溶液重新加入吸附柱中, 离心 1 分钟。 注意: 洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 25 μ L, 体积小降低 DNA 洗脱效率, 减少产量。
二: PCR 产物或者酶切片段等 DNA 纯化
1: 每 100 μ L PCR 扩增后体系或者酶切后体系加入 500 μ L 结合液 DB, 充分混匀。(如果初始体系小于 100 μ L, 请事先用双蒸水调整至 100 μ L)。
2: 平衡液预处理吸附柱: 使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤, 具体方法参见文末“关于平衡液的使用”。
3: 将上一步所得溶液加入吸附柱 EC 中(吸附柱放入收集管中), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。
4: 从此步骤开始和琼脂糖凝胶 DNA 回收的操作步骤 8-11 完全一致, 请参见琼脂糖凝胶 DNA 回收的操作步骤 8-11。

注意事项:

一: 储存注意事项
1: 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37 $^{\circ}$ C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。使用前应该恢复到室温。
2: 储存于低温(4 $^{\circ}$ C 或者 -20 $^{\circ}$ C) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此运输和储存均在室温下(15 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C) 进行。
3: 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。
二: 操作注意事项
1: 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机, 如 Eppendorf5415C 或者类似离心机。
2: 溶胶/结合液中含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或者生理盐水冲洗。
3: 回收纯化的 DNA 片段一般在 100bp 到 40kb 之间, 过长、过短片段的回收效率迅速降低。
4: 回收 DNA 的量和起始 DNA 的量、洗脱体积、DNA 片断大小有关。一般 1-15 μ g, 100bp-5kb 的 DNA 片段, 回收率可高达 85%。



5: 切胶回收时, 紫外灯观察对 DNA 片段有损坏作用, 应该尽可能使用能量低的长波紫外线, 并且尽可能的缩短紫外线下处理的时间。

6: 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA, 不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱, 但应该确保 pH 大于 7.5, pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱, DNA 片段应该保存在 -20°C 。DNA 片段如果需要长期保存, 可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mMTris-HCl, 1mMEDTA, pH8.0), 但是 EDTA 可能影响下游酶切反应, 使用时可以适当稀释。

储存: 室温, 12 个月。

附关于平衡液的使用:

核酸吸附硅胶膜柱长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶膜柱经平衡液预处理后可大大减少柱中硅胶膜的憎水基团, 提高核酸的结合能力, 从而提高硅胶膜柱回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液, 若不小心碰到, 请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖, 以免接触空气。室温保存过程中可能有沉淀生成, 请加热至 37°C 使沉淀完全消失。

使用方法: 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中, 吸取 $100\ \mu\text{L}$ 的平衡液至柱子中。13000rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕, 接后续的操作步骤。

