

## 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒

货号：DP105-01

规格：50次

保存：15-25°C

### 【产品概述】

琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒利用硅基质材料在高盐缓冲系统对 DNA 高效、专一吸附的原理，配备独特的膜结合液（又称溶胶液）和高性能的硅胶膜离心吸附柱，可在 15 min 内清除凝胶、核酸染料及其他杂质，高效回收 DNA 片段。本试剂盒配套的膜结合液和离心吸附柱的最大吸附量为 20 μg，对 100 bp-10 kb 线性双链 DNA 片段的回收效率可高达50-90%，也可用于单链 DNA 片段和质粒 DNA 的纯化。因回收率受 DNA 片段大小、浓度等因素的综合影响，故应尽量加大电泳的 DNA 片段浓度，以提高回收率。回收后的 DNA 片段可以直接用于酶切、连接、测序、标记、杂交和体外转录等多种分子生物学实验。

### 【产品组分】

货号	组分	体积
DP105-101	膜结合液 (MB)	35 ml
DP105-102	膜漂洗液 (MW) 初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀	8 mlx2
DP105-103	洗脱缓冲液 (EB)	5 ml
DP105-104	柱平衡液 (BL) 请使用当天平衡液处理过的吸附柱	30 ml
DP105-105	离心吸附柱及收集管	50套
DP105-106	1.5 ml 无菌离心管	50个

### 【保存条件】

室温 (15-25°C) 保存，保质期一年。如需长期保存，可将各试剂组分置于 2-8°C，使用时如发现结晶，可于 37°C 水浴加热助溶。离心吸附柱不建议低温或大于 30°C 保存，否则可能影响吸附效率。

### 【实验准备】

- 用户需自行准备的材料：含 DNA 样品的琼脂糖凝胶，无水乙醇，异丙醇，水浴锅，切胶设备，台式离心机。
- 初次使用本试剂盒，请按瓶标说明向膜漂洗液 (MW) 中加入相应体积的无水乙醇 (用户自备)，并在试剂瓶上做标记。

### 【操作步骤】

1. **柱平衡**：向离心吸附柱中加入 500 μl 柱平衡液 (BL)，静止 1 min，室温下 ≥12000 rpm 离心 1 min，弃除收集管中的废液，将离心吸附柱重新放回收集管中。（**请使用当天处理过的吸附柱**）
2. **电泳**：根据 DNA 片段的大小选择相应浓度的琼脂糖凝胶进行电泳。  
*注意：高浓度的琼脂糖凝胶所含杂质较多，对回收效率的影响也比较大，因此应根据回收片段的大小，尽可能地选用低浓度的胶。*
3. **切胶**：电泳结束后，在紫外灯下迅速切出目的片段，尽量去除胶块边缘不含 DNA 的部分，并将胶块尽可能地切碎。  
*注意：尽量使用长波长的紫外线，切胶速度要尽量快，以减少紫外线对 DNA 的损伤。*
4. **称量**：将胶块装入一个预先称量过的 1.5 ml 离心管中，称取重量，计算胶重。每管内的胶块不应超过 700 mg。
5. **溶胶**：按每 **1 mg** 凝胶加入 **1 μl** 膜结合液 (MB) 的比例 (**1:1**) 加入膜结合液 (MB)，混匀后置于 55°C 水浴，每间隔 1-2 min 混匀一次，直至胶块完全溶解 (约 5-10 min)。  
*注意：回收 100 bp 以下和 10 kb 以上的 DNA 片段，以及使用 ≥2% 琼脂糖凝胶时，应按 1:3 的比例加入膜结合液 (MB)；溶解 ≥5 kb 的 DNA 片段时，混合动作要轻柔，以免 DNA 断裂。如果回收率较低，可在胶充分溶解后检测 pH 值，如 pH 值大于 7.5，可向含有 DNA 的胶溶胶液中加入 10-30 μl 3 M 醋酸钠 (pH5.2) 将 pH 值调到 5-7 之间。为增加小片段的回收效率，当回收的 DNA 片段小于 400 bp 时，可以加入 1 个凝胶体积的异丙醇。*
6. **DNA 结合**：待凝胶溶液冷却至室温后，转移到插入收集管的离心吸附柱内，静置 1 min，室温下 ≥12,000 rpm 离心 1min，弃除收集管中的废液，将离心吸附柱重新插回收集管中。  
*注意：不可低温离心，否则降低吸附效率；将收集管中的液体重新过柱离心，可提高回收效率；当凝胶溶液的体积超过离心吸附柱的最大容量 950 μl 时，可将凝胶溶液分批转移到同一吸附柱内，分次离心。*
7. **清洗**：加入 600 μl 膜漂洗液 (MW，**请确认已加入无水乙醇!**) 于离心吸附柱中，室温下 ≥12,000 rpm 离心 30 sec，弃除收集管中的废液，将离心吸附柱重新插回收集管中。
8. **再次清洗**：加入 600 μl 膜漂洗液 (MW) 于离心吸附柱中，室温下 ≥12,000 rpm 离心 30 sec，弃除收集管中的废液，将离心吸附柱重新插回收集管中。将离心吸附柱去盖再次离心 2 min，（**如图示方向只需用手轻轻一拉，管盖即会自然轻松脱落**）彻底除去残余漂洗液。



9. **洗脱**: 小心取出离心吸附柱, 将其套入一个 1.5 ml 灭菌离心管中。向硅胶吸附膜的中央加入 50-100  $\mu$ l 洗脱缓冲液 (EB), 室温静置 1 min 后。≥12,000 rpm 离心 1 min 收集纯化的 DNA 片段。

*注意: 为提高回收片段浓度, 离心收集后可将洗脱后的溶液再次加入离心吸附柱中重复洗脱一次, 通常可提高 10-20% 的产量; 也可使用预先加热至 55 °C 的 EB 溶液洗脱以提高产量; 回收 10 kb 以上的 DNA 片段时, 可将洗脱缓冲液 (EB) 加热至 65-70 °C; 如必须使用无菌去离子水洗脱, 需注意其 pH 值是否接近中性, 否则应使用 NaOH 溶液将 pH 值调节至 7.0-8.5 之间。*

10. **储存**: 弃除离心吸附柱, 获得的 DNA 片段可直接用于后续反应或于 -20 °C 长期保存。

*注意: EB 溶液或无菌去离子水洗脱的质粒 DNA, 由于不含 EDTA, 不适于 4 °C 长期保存。*

注: 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒的回收效率

线性 DNA 片段大小	50 bp	100-200 bp	0.2-5 kb	5-10 kb
回收效率	30-50%	50-70%	70-90%	50-70%

#### 【胶回收及 PCR/DNA 片段纯化常见问题分析及其解决方案】

问题	可能原因	解决方案
回收率低	膜结合液 (MB) 使用量不当	按每 1 mg 凝胶或每 1 $\mu$ l DNA 溶液加入 1 $\mu$ l 膜结合液的比例 (1:1) 加入膜结合液
	溶胶不完全	尽量将胶切成小块, 加入膜结合溶液后于 55-65 °C 加热助溶, 确保溶胶彻底
	离心力不足, DNA 未与硅胶膜充分结合	≥12,000 rpm 离心, 如果离心机达不到该转速, 可适当延长离心时间以确保胶溶液完全通过硅胶膜
	膜漂洗液 (MW) 未添加乙醇	第一次使用时按比例添加乙醇, 并在试剂瓶上做标记
	洗脱溶液 pH 值不合适	使用试剂盒提供的洗脱缓冲液 (EB); 如用去离子水洗脱, 需将 pH 值调至 7.0-8.5 范围
	洗脱溶液体积过小	使用 30 $\mu$ l 以上洗脱溶液, 加至硅胶膜的中央, 静置 1 分钟, 使膜完全浸润后再离心
回收产物测序结果不佳	用量太低	提高测序反应使用的 DNA 量; 如果回收产物浓度过低, 可通过乙醇沉淀浓缩产物
	用量过高, 干扰测序结果	降低 DNA 用量, 必要时用 EB 或灭菌双蒸水进行稀释
	TE 缓冲液干扰测序结果	使用无 DNA 酶污染的洗脱缓冲液 (EB) 或灭菌双蒸水溶解 DNA 作为测序模板
	紫外线下暴露时间过长	切胶动作要快, 尽量减少紫外线照射的时间
酶切效果不佳	酶的质量低劣或使用方法不当	按照厂家说明书正确使用酶; 设立阳性对照检测内切酶活性
	膜漂洗液 (MW) 去除不彻底, 胶回收产物中残留有乙醇或盐	再次乙醇沉淀回收, 并确保 DNA 溶液体积不高于酶切反应总体积的 10%
电泳上样时漂出上样孔	未添加上样缓冲液	与适量上样缓冲液混合后上样
	膜漂洗液 (MW) 去除不彻底, 胶回收产物中残留有乙醇	确保洗涤步骤中洗涤缓冲液去除彻底, 可增加离心时间或开盖放置一段时间使残留乙醇挥发
回收产物电泳条带不锐利	DNA 分子断裂	切胶、混合等操作尽量小心, 特别是大片段, 应避免 DNA 因机械损伤而断裂
	其他 DNA 分子污染	使用新配制的琼脂糖凝胶和电泳缓冲液, 刀片应保持清洁, 以避免 DNA 交叉污染
	DNA 分子降解	切下来的胶块如不能及时回收, 应于 4 °C 保存, 避免 DNA 降解
克隆效率低	离心吸附柱漂洗不彻底	再次乙醇沉淀回收
	回收过程中有外切酶污染, 导致 DNA 片段末端序列缺失	用新鲜配制的胶和电泳缓冲液进行电泳; 胶回收保证无菌操作
	感受态细胞的效率差	确保感受态制备和保存方法正确

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 承诺为您更换等量合格产品, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。