

AipBest 琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型)

AipBest Agarose Gel DNA Purification Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆版本号：240220

◆目录号：DR201

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	100 次 (DR201-02)	200 次 (DR201-03)
平衡液	室温	10mL	20mL
溶胶液 DD	室温	75mL	150mL
漂洗液 WB	室温	25mL	50mL
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	15mL	15mL
吸附柱 EC 和收集管	室温	100 套	200 套

◆适用范围：适用于琼脂糖凝胶 DNA 回收。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。储存于低温(4℃或-20℃)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(15-25℃)进行。

◆产品介绍：试剂盒为琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收的专用试剂盒，适用于琼脂糖凝胶 DNA 的纯化回收。本试剂盒的原理是在高离序盐存在的情况下，DNA 片断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—离心等步骤，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。

◆产品特点：

1. 操作简单，快速便捷，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
2. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
3. 使用了优质溶胶液，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。
4. 溶胶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，极大的提高回收效率。改进的溶胶液配方，极大的提高了缓冲能力和

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。

◆**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 12,000rpm 的传统台式离心机。
2. 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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。使用前应该恢复到室温。
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。
4. 溶胶液中含有刺激性化合物，操作时请穿实验服并佩戴一次性乳胶手套，实验操作中应避免避免沾染皮肤，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。
5. 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。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%。
6. 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。
7. 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(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

◆**关于平衡液的使用：**

1. **介绍：**核酸吸附硅胶膜柱子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。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。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。在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。
2. **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 μ L 的平衡液至柱子中。12,000rpm 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。

◆**操作步骤：**

提示：第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中按照该组分标签上的指示，加入指定量无水乙醇！并打钩做好标记避免重复加入！

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 1.5mL 离心管，称重。

注：先称一个空 1.5mL 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 倍体积溶胶液 DD。

注：如果凝胶重为 100mg，其体积可视为 100 μ L，则加入 300 μ L 溶胶液。

注：如果凝胶浓度大于 2%，应加入 6 倍体积溶胶液。

4. 56 $^{\circ}$ 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. 可选步骤(一般不需要)：每 100mg 最初的凝胶重量加入 150 μ L 的异丙醇，震荡混匀。

注 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。

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，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

6. 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：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。

注：过滤下的溶胶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。

7. 加入 600 μ L 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

8. 重复操作步骤 7 一遍。

9. 将吸附柱 EC 放回空收集管中，12,000rpm 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。

10. 取出吸附柱 EC，放入一个新的无酶离心管中，在吸附膜的中间部位加入 30-50 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，12,000rpm 离心 1 分钟。收集得到的 DNA。DNA 可以存放在 -20 $^{\circ}$ C，如果要长时间存放，可以放置在 -70 $^{\circ}$ C 保存。

注：洗脱体积越大，洗脱效率越高。如果需要较多量 DNA，可将第一次得到的洗脱液重新加入吸附柱中，重新洗脱一遍。如果需要 DNA 浓度较高，可适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 25 μ L，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少产量。

=====

