北京博凌科为生物科技有限公司
Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.
Tel:010-57158602/52872342/80773165（Fax）
Http://www.blkwbio.com/
E-mail:blkwbio@blkwbio.com

- 多功能DNA纯化回收试剂盒
- 目录号 **1303**
- 使用手册
- 实验室使用，仅用于体外

多功能DNA纯化回收试剂盒

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次 (130301)	100 次 (130302)	200 次 (130303)
平衡液	室温	5ml	10ml	20ml
溶胶/结合液 DB	室温	50 ml	100ml	200 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	15 ml	20 ml
吸附柱 EC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管（2ml）	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

❖ 适用范围：

适用于琼脂糖凝胶 DNA 回收、PCR 反应产物纯化回收、酶切产物 DNA 片断纯化回收、探针标记后纯化回收、DNA 样品浓缩等。

储存事项:

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℃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℃或者－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。
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。

❖ 产品介绍：

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。

❖ 产品特点：

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 溶胶液/结合液调制成为了黄颜色，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。
5. 改进的溶胶液配方,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。
6. 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。

❖ 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Eppendorf 5415C 或者类似离心机。

2. 溶胶液/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1-15μg，100bp-5kb的DNA片段，回收率可高达85％－95％。

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℃。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℃使沉淀完全消失。

2. **什么情况下使用：**一般刚买来 2, 3 个月的新硅胶柱子不需要使用平衡液。时间存放较长吸附效率降低的硅胶柱子，可使用平衡液进行预处理来提高硅胶柱子结合能力从而提高核酸产量。或者预期片段难回收，或者回收起始量低预期产量低的情况，也可使用平衡液来提高回收效率。

3. **使用方法：**取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100μl 的平衡缓冲液至柱子中。13000 rpm 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 中加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入!

1. 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 1.5ml 离心管，称重。

   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/结合液 DB。

   如果凝胶重为 100mg，其体积可视为 100μl，则加入 300μl 溶胶液。

   如果凝胶浓度大于 2%，应加入 6 倍体积溶胶液。

4. 56℃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 100mg 最初的凝胶重量加入 150μl 的异丙醇，震荡混匀。

   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. 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。

   如果总体积超过 750μl，可分两次将溶液加入同一个吸附柱 EC 中。

7. 加入 600μl 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. 加入 600μl 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

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，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 50μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000rpm 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。

    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 25μl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少产量。

2. PCR 产物或者酶切片段等 DNA 纯化：

1. 每 100μlPCR 扩增后体系或者酶切后体系加入 500μl 溶胶/结合液 DB，充分混匀。（如果初始体系小于 100μl，请事先用双蒸水调整至 100μl）。

2. 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。

3. **从此步骤开始和琼脂糖凝胶 DNA 回收的操作步骤 7-10 完全一致，请参见琼脂糖凝胶 DNA 回收的操作步骤 7-10。**

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
核酸产量低或者纯度不高	*试剂盒储存在非最佳条件-**建议：**收到试剂盒后总是存放在室温（15℃-20℃）。 *缓冲液或者试剂暴露于减少它们有效性的条件下-**建议：**储存在室温（15℃-20℃），每次用完后立刻盖紧盖子，以免溶液蒸发，pH 改变和污染。 *漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-**建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。** *试剂和要回收溶液如 PCR 产物没有充分混匀-**建议：**加入每个试剂后都要充分混匀。
洗脱后回收率低	*使用了非最佳的洗脱液，洗脱液的高 pH 非常重要-**建议：**不要用水洗脱，用试剂盒带的洗脱液 EB.。

问题	评论与建议
纯化的 DNA 产物 OD_{260} 数值异常偏高	*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了分光光度计读数-**建议：**将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
回收后 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*忘记做步骤 9，乙醇抑制了酶切反应-**建议：**做步骤 9，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。 *一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-**建议：**将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用，
洗脱液中不含 DNA	*在初始处理材料中没有 PCR 产物-**建议：**开始回收前，用琼脂糖凝胶/EB 电泳检测 PCR 产物。
回收后 DNA 的浓度太低	*起始的处理材料中 DNA 含量太低-**建议：**加大处理量和减少洗脱液的体积，但注意不要少于 30μl。 *回收的片段小于 100bp 或者大于 10kb -**建议：**片段小于 100bp 或者大于 10kb 回收效率都会迅速降低，可尝试提高起始处理量。
回收产量不高	*使用的溶胶/结合液的量不足-**建议：**确保 PCR 产物体积和溶胶/结合液的比例是 1:5.，PCR 覆盖的油，蜡，上样液的颜料并不影响回收过程。 *洗脱不完全-**建议：**可使用 2 次洗脱缓冲液 EB 洗脱（每次 30μl），合并两次洗脱液。