

通用胶回收/DNA 清洁纯化试剂盒

KD501 100 次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	200 次
平衡液	室温	5ml	10ml	20ml
溶胶/结合液 HB (高浓度)	室温	20ml	40ml	80ml
漂洗液 WB	室温	13 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	15 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°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°C 或者 -20°C) 会造成溶液沉淀, 运输和储存均在常温下 (15°C-25°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。

产品介绍:

在高离序盐存在的条件下, 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. 使用了优质异硫氰酸胍配制的溶胶/结合液 HB, 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. **采用高浓度的溶胶/结合液 HB, 可以等体积溶胶, 减少操作步骤。**
4. 独特的溶胶/结合液 HB 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。
5. 溶胶/结合液 HB 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。
6. 改进的溶胶/结合液 HB 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。
7. 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. 溶胶/结合液 HB、平衡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。**
2. 回收纯化的 DNA 片段一般在 100 bp 到 40 kb 之间, 过长、过短片段的回收效率迅速降低。
3. 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, 100 bp-5 kb 的 DNA 片段, 回收率可高达 85% - 95%。
4. 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。
5. **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 $^{\circ}$ 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

- 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。
- 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 的平衡缓冲液至柱子中。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 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!

琼脂糖凝胶 DNA 回收:

- 在长波紫外灯或者蓝光下, 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。
- 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 1.5 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。
- 每 100 mg 的 1%琼脂糖凝胶加 100 μ l 溶胶/结合液 HB (高浓度)。
对于高浓度的琼脂糖凝胶, 溶胶/结合液 HB (高浓度) 加入量需等比例增加。
为简化实验, 建议溶胶/结合液 HB (高浓度) 的加入量统一为 400 μ l。
- 56°C水浴放置 5-10 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。
- 可选, 一般不需要:** 对于 400 bp 以下片段, 建议加入 0.3 倍体积的异丙醇, 可提高回收率。

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，12,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。

过滤下的溶胶/结合液 HB 和收集管内残存的强碱性平衡液混合后，溶胶/结合液 HB 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!)，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

8. 重复步骤 7 一遍。

9. 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。

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 50 μ l 洗脱缓冲液 EB。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。

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，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少产量。

起始样品少的情况下，洗脱缓冲液事先在 80-100 $^{\circ}$ C 水浴中加热可提高洗脱效率。

PCR 产物或者酶切片段等 DNA 纯化

1. 估计 PCR 反应液或酶切反应液的体积，向其中加入 3 倍体积溶胶/结合液 HB (高浓度)。充分混匀 (无需去除石蜡油或矿物油)。

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”

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，12,000 rpm 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。