

# DNA片段凝胶回收试剂盒 (离心柱型)

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。

目录号: SE010 5次 试  
目录号: SE011 50次  
目录号: SE012 100次  
目录号: SE014 500次

## 使用手册

2010年12月, 第5版

 **北京三博远志生物技术有限责任公司**  
**Beijing Sunbiotech Co. , Ltd**

地 址: 北京海淀区东北旺南路 26 号

电 话: 010-62961251 62976446 传真: 010-62961251

网 址: 阳光生物网 <http://www.sunbiotech.com.cn>

Email: [market@sunbiotech.com.cn](mailto:market@sunbiotech.com.cn)

 **北京三博远志生物技术有限责任公司**  
**Beijing Sunbiotech Co. Ltd**

## 一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	5次 SB010 试用装	50次 (SB011)	100次 (SB012)	500次 (SB014)
溶胶结合液 BD	室温	4ml	40 ml	80 ml	400 ml
漂洗液 W	室温	2.4ml	24 ml	48 ml	120×2 ml
		<b>第一次使用前按说明加指定量乙醇</b>			
洗脱液 EB	室温	1ml	5 ml	10 ml	50 ml
吸附柱 AC	室温	5 个	50 个	100 个	500 个
收集管 (2ml)	室温	5 个	50 个	100 个	500 个
说明书	室温	1 份	1 份	1 份	1 份

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

### 注意事项

1. 第一次使用前在漂洗液 W 中按 4: 7 的比例加入无水乙醇, 如包装为 24ml 漂洗液 W 中, 应加入 42ml 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!
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℃ 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。使用前应该恢复到室温。
3. 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。
4. 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。

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. 回收的 DNA 量和起始 DNA 的量, 洗脱体积, DNA 片断大小有关。一般回收的量为 5-25μg, 大小为 100bp-10kb 的 DNA 片段, 回收率可达 85%—95%。更大或更小回收效率较低。特别是大于 50kb 或小于 10bp 效率更低。
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 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, PH 8.0) 有可能影响下游酶切、连接、测序等反应, 可以用水洗脱。用水洗脱 DNA 片段应该保存在 -20℃。

## 五、操作步骤

\* 第一次使用前在漂洗液 W 中按 4: 7 的比例加入无水乙醇, 如包装为 2.4ml 漂洗液 W 中, 应加入 4.2ml 无水乙醇!

### (一)、以下为琼脂糖凝胶 DNA 回收操作步骤。

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. 加三倍体积溶胶/结合液 BD。  
如果凝胶重为 0.1g, 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。  
凝胶块最大不能超过 400mg, 如果超过 400mg, 请用多个离心柱进行回收。

- 50-60°C水浴放置 10 分钟（或直至胶完全溶解）。每 2-3 分钟涡旋振荡一次或颠倒离心管 2 次帮助加速溶解。
- 将上一步所得溶液冷却后加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。

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

6. 加入

550 μl 漂洗液 W，12,000 rpm 离心 1 分钟后，弃去废液；

**（请先检查是否已加入无水乙醇！）**

- 重复步骤 6 一次（小于 500bp 或浓度低的样品，不重复此步骤。一般样品不需要此步骤纯度完全可以）；
- 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000 rpm 空离心 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。
- 取出吸附柱 AC，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°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离心吸附柱中，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 30 μl，体积小降低 DNA 洗脱效率，减少产量。**

## （二）、以下为 PCR 产物或者酶切片段等 DNA 纯化操作步骤。

- 每 100μl PCR 扩增后体系或者酶切后体系加入 300μl 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）。
- 将上一步所得溶液加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。

**3-6. 从此步骤开始和琼脂糖凝胶 DNA 回收的操作步骤 6-9 完全一致，**

**请参见琼脂糖凝胶 DNA 回收步骤 6-9。**

## 六、疑难解答（Trouble shooting）

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
核酸产量低或者纯度不高	试剂盒储存非最佳温度	存放在室温（15°C-20°C）
	洗脱液或者试剂暴露于减少它们有效性的条件下	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 W 中忘记加无水乙醇	<b>第一次实验时，在漂洗液 W 中加入指定量无水乙醇。</b>
	试剂没有和 PCR 凝胶溶液或其他要纯化的溶液充分混匀	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	不要用水洗脱，用试剂盒带的洗脱液 EB。
回收后 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	忘记做空离心，乙醇抑制了酶切反应	不要省去步骤 8 空离心，在空气中晾几分钟，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	将洗脱的回收 DNA 溶液 13，000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用，
纯化的 DNA 产物 OD <sub>260</sub> 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	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	开始回收前，用琼脂糖凝胶/EB 电泳检测 PCR 产物。

## 二、原理简介

三博远志自用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,是经过大量实验得出的最佳制品,该试剂盒回收差异小、得率高、操作简便、质量稳定,三博远志 PCR 测序成功率高有试剂盒的功劳!可大量供货!

Sunbiotech DNA 片段凝胶回收试剂盒,利用硅胶膜在低 pH 值高盐状态下可特异性吸附 DNA,在低盐高 pH 值洗脱的原理,可从 TAE 或 TBE 琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段,可去除 PCR 反应中的 dNTPs、引物、矿物油和聚合酶等及 DNA 样品中的其它杂质,得到的 DNA 片段可用于酶切、连接、测序、PCR 反应模板等后续操作。

## 三、试剂盒特点

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,也可以 PCR 产物清洁纯化,酶切产物纯化回收等多种功能。
4. 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。

## 四、注意事项(实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成,使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机,如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。

## 接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
回收后DNA的浓度太低	起始的处理材料中 DNA 含量太低	加大处理量和减少洗脱液的体积,但注意不要少于 30 $\mu$ l。
	回收的片段小于 100bp 或者大于 10Kb	片段小于 100kb 或者大于 10bp 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/结合液的数量不足	确保 PCR 产物体积和溶胶/结合液的比例是 1:3 PCR 覆盖的油、蜡、上样液的颜色并不影响回收过程。
	洗脱不完全	可使用 2 次洗脱缓冲液 EB 洗脱(每次 30 $\mu$ l),合并两次洗脱液。