

## 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒（目录号：RTP2201）

## ※ 试剂盒内容及保存：

试剂盒组成	RTP2201-02 (100次)	RTP2201-03 (200次)	贮存方式
溶胶液PN	100 ml	2 × 100 ml	室温
3 M NaAc pH5.2	500 μl	500 μl	室温
漂洗液PW（浓缩液）	25ml	2 × 25ml	室温
洗脱缓冲液EB	15ml	15ml	室温
吸附柱CA1	100个	2 × 100个	室温
收集管（2ml）	100个	2 × 100个	室温
说明书	1份	1份	

## ※ 储存条件：

本试剂盒在室温（15–25℃）干燥条件下，可保存12个月；更长时间的保存可置于2–8℃。（注意：当低温贮存时，使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在37℃水浴中预热10–20分钟，以平衡溶液温度。）

## ※ 产品简介：

本试剂盒采用可以高效、专一结合DNA的硅基质材料和独特的缓冲液系统，从TAE或TBE琼脂糖凝胶上回收DNA片段，同时去除蛋白质、其它有机化合物、无机盐离子及寡核苷酸引物等杂质。可回收100bp–40kb大小的片段，回收率大于80%（<100 bp 和>10kb 的DNA片段回收率为30–50%）。

每个吸附柱每次最多可吸附的DNA量约为10 μg。

使用本试剂盒回收的DNA适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、文库筛选、连接和转化等实验。

## ※ 产品特点：

- 1 溶胶液PN为亮黄色，便于观察胶是否彻底融化和溶胶体系的pH是否合适。

- 2 操作快捷，单个样品操作少于15分钟。

## ※ 注意事项：

- 1 电泳时最好换用新鲜的电泳缓冲液，以免影响电泳和回收效果；如有可能，尽量使用TAE系统，因为有研究指出使用TBE系统后，回收产物中的痕量硼酸会影响后续的酶切反应。
- 2 切胶时，请尽量使用长波长的紫外光（360nm）；如果仅有短波长紫外光（254–312nm）的话，请尽可能缩短紫外照射时间，以免对DNA造成损伤；请尽量去除不含目的片段的琼脂糖凝胶，这将会对融胶很有帮助。
- 3 第一次使用前请按照标签说明在漂洗液PW中加入无水乙醇，并做好标记，用完后拧紧瓶盖。

## ※ 操作步骤：

如非指出，所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

- 1 将单一的目的DNA条带从琼脂糖凝胶中切下（尽量切除多余部分）放入干净的离心管中，称取重量。
- 2 向胶块中加入3倍体积溶胶液PN（如果凝胶重为100mg，其体积可视为100 μl，则加入300 μl溶胶液），50–55℃水浴放置10分钟，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。

注：● 如果此时溶胶液变为粉红色，请加入少量3M NaAc pH5.2（一般说来，10 μl足矣），使溶胶液变为黄色再上柱离心。

- 对于高浓度的凝胶（>2%），按照100mg凝胶加入100 μl灭菌水和600 μl溶胶液PN的比例加入溶胶液PN。
- 胶块完全溶解后最好将胶溶液温度降至室温再上柱，因为吸附柱在较高温度时结合DNA的能力较弱。

- 3 可选步骤：当目的片段<500bp时，如想提高回收效率，向溶胶体系种加入1/3溶胶液PN体积的异丙醇，混匀，50–55℃温浴1分钟后再进行步骤4。当目的片段>500bp时，省略此步骤，直接进行步骤4。

4 将上一步所得溶液加入到吸附柱CA1中（吸附柱放入收集管中），室温放置2分钟，10,000g离心30–60秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

**注：**● 吸附柱CA的有效容积为800 μl，如溶胶体系体积大于800 μl，分次上柱，保证全部溶液都加到吸附柱中。

● <100bp和>10kb的片段请在室温放置5–10分钟，这将会提高回收效率。

5 向吸附柱中加入700 μl漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），10,000g离心30–60秒，倒掉废液，将吸附柱重新放入收集管中。

6 向吸附柱中加入500 μl漂洗液PW，10,000g离心30–60秒，倒掉废液。

7 将离心吸附柱CA1放回收集管中，10,000g离心2分钟，尽量除去漂洗液。

**注：此步必不可少！如果漂洗液有残留，将会影响回收效率和DNA质量，进而影响下游实验；离心后将吸附柱盖子打开，室温放置2分钟，这样将有助于彻底挥发残余乙醇。**

8 将吸附柱放到一个干净离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加30–100 μl洗脱缓冲液EB，室温放置2分钟，10,000g离心2分钟收集DNA溶液。

**注：**● 可将洗脱缓冲液EB预热到60–70℃后再加到吸附膜上，这样可以提高洗脱效率。

● CA1柱的洗脱体积不应少于30 μl，体积过小将会降低回收效率。

● 洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0–8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率

9 DNA产物–20℃保存。

### 琼脂糖凝胶常见问题分析：

常见问题	可能原因	建议
片段未回收或回收率低	漂洗液PW中未加入无水乙醇或加入的比例不正确	首次使用前请严格按照标签说明加入无水乙醇；用完后盖紧瓶盖，以防乙醇挥发
	凝胶没有完全溶解	按照凝胶重量与溶胶液PN的体积比为1:3加入溶胶液，并在融化过程中间歇混匀使凝胶完全融化
	溶胶体系pH太高	如果溶胶体系变为粉红色，说明溶胶体系pH太高，DNA不能与吸附柱有效结合，用少量NaAc pH5.2将溶液颜色调至黄色
	洗脱缓冲液pH不合适	吸附柱上的DNA在低盐和高pH条件下被有效洗脱。其最大洗脱效率pH在7.0–8.5之间。如用灭菌水洗脱，保证pH在其范围内
	洗脱体积太小	洗脱体积不能低于30 μl，并保证洗脱液加到吸附柱中间位置
回收后的片段无法正常进行后续实验如连接后的转化效率低	切胶时紫外线照射时间过长，DNA变性	紫外线对DNA的破坏会导致连接后的转化效率大大降低。切胶时尽量使用长波紫外线（360nm）并提高切胶速度
	回收产物中含有乙醇	漂洗液PW两次漂洗后，离心2分钟必不可少；离心后开盖室温放置2分钟有助于残余乙醇挥发
	回收片段电泳有时出现双带或多带现象	PCR产物更易出现如此情况，小片段尤其甚。这种现象出现的原因不详，可能与片段GC含量和序列有关。如果出现这种现象，以下方案可以参考：将洗脱产物95℃加热2分钟，移至室温自然冷却，即可恢复单带构型。另外一种方法：回收的此种片段–20℃贮存一周左右，大部分即可自然复性