

## DNA Purification Kit

REF: EG23701S

### 储运条件

15~25°C保存，常温运输

### 产品组成

组分	规格 (100 rxns)
Buffer B	10 ml
Buffer DB	2×50 ml
Buffer WB	2×15 ml
Buffer EB	15 ml
Adsorption columns EC & Collection Tubes (2 ml)	2×50 套

Buffer B: 平衡液;

Buffer DB: DNA 结合液;

Buffer WB: 漂洗液, 使用前按瓶上指定体积加入无水乙醇;

Buffer EB: 洗脱液;

Adsorption columns EC &amp; Collection Tubes: 吸附柱 EC &amp; 滤液收集管。

### 产品简介

本试剂盒采用优化的缓冲体系和进口高性能硅胶柱纯化技术，可从各种浓度的 TAE 或 TBE 琼脂糖凝胶中回收 100 bp~40 kb 的 DNA 片段，也可直接从 PCR 产物、酶促反应体系或其它各种方法获得的 DNA 粗制品中纯化 DNA 片段，同时除去蛋白质、其它有机化合物、无机盐离子及寡核苷酸引物等杂质。纯化的 DNA 可直接用于连接、转化、酶切、体外转录、PCR、测序、微注射等分子生物学研究。

### 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 片段纯化回收、探针标记后纯化回收、DNA 样品浓缩等。回收片段范围为 100 bp~40 kb。

### 自备材料

1.5 ml 灭菌离心管，无水乙醇，异丙醇 (回收片段 <300 bp 时添加)，水浴锅。

### 注意事项

1. Buffer DB 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. 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 水浴加热几分钟使其恢复澄清。使用前应该恢复到室温。

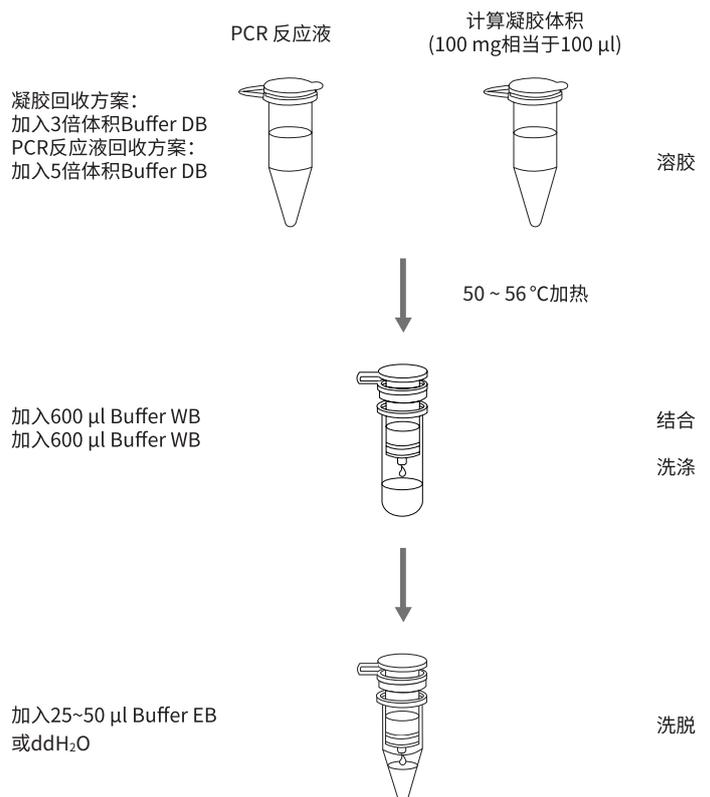
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

4. 回收率与初始 DNA 量和洗脱体积有关，初始量越少、洗脱体积越少，回收率越低。若需要提高 DNA 回收率，推荐使用 Buffer B 先平衡吸附柱。

5. 对于 >10 kb 的 DNA 片段可以适当增加吸附和洗脱时间。

6. 将 Buffer EB 或 ddH<sub>2</sub>O 加热至 65~70°C，有利于提高 DNA 洗脱效率。

### 实验原理与流程概要



## 实验流程

**提示：第一次使用前按 Buffer WB 试剂瓶标签所示，加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，避免多次加入，然后置于室温保存。**

### 1. 琼脂糖凝胶 DNA 回收实验步骤

① DNA 电泳结束后，在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。

注：将凝胶切成细小的碎块可大大缩短凝胶溶化时间从而提高回收率（线型 DNA 长时间暴露在高温条件下易于水解）。勿将含 DNA 的凝胶长时间地暴露在紫外灯下，减少紫外线对 DNA 造成的损伤。

② 将切下的含有 DNA 条带凝胶放入 1.5 ml 离心管，称重。

注：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。

③ 加 3 倍体积 Buffer DB。

注 1：如果凝胶重为 100 mg，其体积可视为 100  $\mu$ l，则加入 300  $\mu$ l 溶胶液。

注 2：如果凝胶浓度 >2%，应加入 6 倍体积溶胶液。

④ 56°C 水浴放置 10 min（或直至胶完全溶解）。每 2~3 min 涡旋震荡一次加速溶解，确保凝胶块完全溶解。

注：凝胶块必须完全溶化，否则将严重影响 DNA 回收率。

⑤（可选）当回收 <300 bp DNA 片段时，按每 100 mg 最初的凝胶重量补加 150  $\mu$ l 异丙醇。如果凝胶浓度 >2%，则按每 100 mg 最初的凝胶重量补加 300  $\mu$ l 异丙醇，震荡混匀。

⑥（可选）将吸附柱置于收集管中，加入 100  $\mu$ l Buffer B 至吸附柱膜上。12,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注：如果吸附柱放置时间过长、暴露于空气时间过久或者回收率偏低时，推荐采用此步。Buffer B 处理过的柱子应当天使用，放置时间过长会影响效果。

⑦ 将  $\leq 750$   $\mu$ l 溶胶液转移至吸附柱中，室温静置 1 min，12,000 rpm 离心 30~60 s。弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注 1：如果溶胶液 >750  $\mu$ l，则按每次 750  $\mu$ l 加入至同一个吸附柱中，重复步骤 7。

注 2：过滤下的 Buffer DB 和收集管内残存的强碱性 Buffer B 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。

⑧ 加入 600  $\mu$ l Buffer WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30~60 s，弃掉废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注：请沿吸附柱壁四周加入 Buffer WB，或加入 Buffer WB 后盖盖颠倒混匀 2~3 次，有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

⑨ 重复步骤 8。

⑩ 12,000 rpm 离心 2 min 干燥吸附柱，目的是将吸附柱中残留的 Buffer WB 彻底去除。

⑪ 将吸附柱置于一个新的无菌 1.5 ml 离心管中。在吸附膜的中间部位加入 50  $\mu$ l Buffer EB。室温静置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min 洗脱 DNA。

注：洗脱体积不应少于 25  $\mu$ l，低于 25  $\mu$ l 会导致洗脱效率下降。若需要获得最高产量，建议将 Buffer EB 预热至 65~70°C 以提升回收效率。此外可以将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，重复步骤 11 进行二次洗脱。若后续做测序需使用 ddH<sub>2</sub>O 洗脱，并确保 ddH<sub>2</sub>O 的 pH 在 7.0~8.5 范围内，pH 低于 7.0 会降低洗脱效率。

⑫ 弃去吸附柱，DNA 产物保存于 -20°C，以防止 DNA 降解。

### 2. 反应液 DNA 回收实验步骤

该方案适用于 PCR 产物或酶切产物等 DNA 纯化。

① 短暂离心 PCR 产物或酶切产物。用移液枪测量其体积，并转移至灭菌的 1.5 ml 或 2 ml 离心管中。若样品体积 <100  $\mu$ l，需用 ddH<sub>2</sub>O 补充至 100  $\mu$ l。

② 按每 100  $\mu$ l 产物加入 500  $\mu$ l Buffer DB，颠倒或涡旋混匀。

③ 将上一步所得溶液按照  $\leq 750$   $\mu$ l 转移至吸附柱中，室温静置 1 min，12,000 rpm 离心 30~60 s。弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注：如果溶胶液 >750  $\mu$ l，则按每次 750  $\mu$ l 加入至同一个吸附柱中，重复步骤 3。

④ 后续步骤按胶回收实验第 8~12 步进行操作。

## 常见问题与解决方案

### 1. DNA 回收率低

琼脂糖凝胶未完全溶化：尽可能去除不含目的片段的琼脂糖凝胶，溶胶过程间隔性的颠倒混匀促进凝胶充分溶化，仔细检查确保无固体琼脂糖凝胶残留。

回收片段过小：<300 bp 片段时，需补加 0.5 倍 Buffer DB 体积的异丙醇。

试剂准备有误：Buffer WB 需加入乙醇稀释或乙醇体积不准确（乙醇浓度需控制在 80%）。

洗脱效率低：将 Buffer EB 预热至 65~70°C，并重复二次洗脱。

回收 DNA 初始样本量过高：降低 DNA 回收初始样本量或者吸附柱使用前先用 Buffer B 平衡柱子。

### 2. 下游结果不理想

盐污染：确保用 Buffer WB 洗脱两次；此外沿吸附柱管壁四周加入 Buffer WB，或加入 Buffer WB 后盖盖颠倒混匀 2~3 次有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。

琼脂糖凝胶残留：尽可能去除不含目的片段的琼脂糖凝胶，溶胶过程间隔性的颠倒混匀促进凝胶充分溶化，仔细检查确保无固体琼脂糖凝胶残留。

洗脱产物中有单链 DNA：将洗脱产物 95°C 加热 2 min，缓慢冷却至室温，使单链 DNA 重新退火即可。