

琼脂糖凝胶回收/PCR 产物纯化试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

用于琼脂糖凝胶中 DNA 片段（<10kb）的回收及 PCR 扩增产物中 DNA 片段的纯化。

【检验原理】

溶胶缓冲液溶解琼脂糖凝胶。在高盐低 pH 值的环境下，吸附柱内的硅胶膜高效吸附 DNA；洗涤吸附柱，去除痕迹琼脂糖、盐、引物等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶膜释放吸附的 DNA，从而达到快速回收纯化 DNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	试剂名称	50T	100T	200T
MDT-Pu04	溶胶缓冲液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	120mL×1 瓶
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	AW2 缓冲液	6mL×1 瓶	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	50 支	100 支	200 支
	洗脱液 B	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶
	3M 乙酸钠	0.5mL×1 支	1mL×1 支	2mL×1 支
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

所有成分：常温（10-30℃）运输保存，有效期 1 年。

【注意事项】 使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 提前配制RAW1, RAW1中乙醇含量低于60%会影响提取效果。
2. 提前配制AW2, AW2中乙醇含量低于80%会影响提取效果。
3. 溶胶缓冲液包含pH指示剂, 其在 $\text{pH} \leq 7.5$ 时为黄色, 缓冲液在较高pH下为橙色或紫色。吸附柱对DNA的吸附仅在 $\text{pH} \leq 7.5$ 时有效, 吸附最佳pH在5.0至7.0之间。
4. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
5. 虽然本产品无氯仿、苯等OSHA规定的危险物品, 但操作时最好做好必要的防护措施, 戴口罩手套, 并且在通风的生物安全柜中进行。
6. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

含目标 DNA 片段 ($< 10\text{kb}$) 的琼脂糖凝胶; PCR 扩增产物。

【自备器械和试剂】

小型高速离心机 (最大离心力 $\geq 12,000 \times g$)、振荡恒温金属浴、1.5mL 离心管、无水乙醇和异丙醇等。

- **RAW1 配制:** RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇, 使乙醇含量为 60%, 混匀后密封常温保存。
- **AW2 配制:** AW2 缓冲液使用前按瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇, 使乙醇含量为 80%, 混匀后密封常温保存。

【样本处理】

一、琼脂糖凝胶

1. 选择干净锋利的刀片，在紫外灯下（注意防护），从琼脂糖凝胶中切取目的DNA条带。

▶要最大限度地去除多余的琼脂糖。

2. 将凝胶放入干净的1.5mL离心管中，称重。加入3倍体积的溶胶缓冲液（100mg的琼脂凝胶等于100 μ L体积的溶液）。

▶每100mg凝胶加入300 μ L溶胶缓冲液。对于> 2%琼脂糖凝胶，加入5倍体积的溶胶缓冲液。

▶每个吸附柱加入的最大凝胶量为400mg，对于> 400mg的凝胶，使用多个吸附柱

3. 在60 $^{\circ}$ C下1,500rpm振荡孵育（或60 $^{\circ}$ C孵育过程中手工振荡4-5次）至凝胶完全溶解（大约5分钟）。

▶确保琼脂糖凝胶完全溶解。

4. 凝胶完全溶解后，检查混合液的颜色是否为黄色（类似于溶胶缓冲液的颜色）。如果混合液的颜色是橙色或紫色，加入10 μ L的3M乙酸钠混匀，使混合液的颜色变为黄色。

5. 向混合液中加入1倍凝胶体积的异丙醇，吹打混匀。比如：100mg琼脂糖凝胶加入100 μ L异丙醇。

▶PCR产物片段小于100bp 片段时，加入1.5倍凝胶体积的异丙醇。比如，100mg的琼脂糖凝胶加入150 μ L异丙醇。

▶异丙醇加入量过多影响提取效率。

▶加入异丙醇后不能离心样品。

二、PCR产物

1. 在1.5mL离心管中加入PCR产物和5倍PCR产物体积的溶胶缓冲液，混匀。比如：50 μ L PCR产物加入250 μ L溶胶缓冲液。

2. 检查混合液的颜色是否为黄色（类似于溶胶缓冲液的颜色）。如果混合液的颜色是橙色或紫色，加入10 μ L的3M乙酸钠混匀，使混合液的颜色变为黄色。

3. 向混合液中加入2倍PCR产物体积的异丙醇，吹打混匀。比如50 μ L PCR产物加入100 μ L异丙醇。

► PCR产物片段小于100bp片段时，加入3倍PCR产物体积的异丙醇。

【琼脂糖凝胶回收快速操作流程】

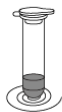


切胶称重

1. 准备工作

检查RAW1是否配制。

检查AW2是否配制。

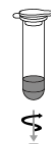


振荡加热

2. 用刀片，从琼脂糖凝胶中切取目的DNA条带。

3. 放入 1.5 mL 离心管中，称重。加 3 倍体积的溶胶缓冲液。

4. 在60°C下1,500rpm振荡孵育（或60°C孵育过程中手工振荡4-5次）至凝胶完全溶解（约5分钟）。

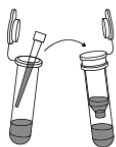


沉淀核酸

5. 检查混合液的颜色是否为黄色。如果混合液的颜色是橙色或紫色，加入10μL的3M乙酸钠混匀，使混合液的颜色变为黄色。

6. 向混合液中加入1倍凝胶体积的异丙醇，吹打混匀。

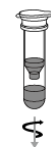
7. 将吸附柱放入收集管中，转移全部液体至吸附柱。



过柱吸附

8. 闭盖12,000×g离心1分钟。吸弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。

9. 加入600μL RAW1，12,000×g离心20秒。吸弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。



洗涤

10. 加入600μL AW2，12,000×g离心20秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

11. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，12,000×g离心3分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。



洗脱

12. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，加入50μL洗脱液B至吸附柱中心位置。闭盖室温静置3分钟，12,000×g离心1分钟，收集洗脱液。

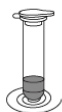
【PCR 产物回收快速操作流程】



加样

1. 准备工作

- 检查RAW1是否配制。
- 检查80%乙醇水溶液是否配制。



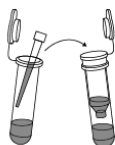
沉淀核酸

2. 在1.5mL离心管中加入PCR产物和5倍PCR产物体积的溶胶缓冲液，混匀。

3. 检查混合液的颜色是否为黄色。如果混合液的颜色是橙色或紫色，加入10 μ L的3M 乙酸钠混匀。

4. 向混合液中加入2倍PCR产物体积的异丙醇，吹打混匀。

5. 将吸附柱放入收集管中，转移混合液至吸附柱。



过柱吸附

6. 12,000 \times g离心1分钟。吸弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。

7. 加入600 μ L RAW1，12,000 \times g离心20秒。吸弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。



洗涤

8. 加入600 μ L AW2，12,000 \times g离心20秒。取出吸附柱，丢弃收集管。

9. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，12,000 \times g离心3分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。



洗脱

10. 将吸附柱放入新的1.5mL离心管中，加入50 μ L洗脱液B至吸附柱中心位置。闭盖室温静置3分钟，12,000 \times g离心1分钟，收集洗脱液。

【操作步骤】

1. 将吸附柱放入收集管中，转移全部液体至吸附柱。

▶吸附柱一次最大容量为800 μ L，对于体积超过800 μ L的样品分批加入

▶转移液体时，避免液体接触吸附柱的管口。

2. 闭盖 12,000 \times g 离心 1 分钟。吸弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。

3. 开盖，在吸附柱中加入600 μ L RAW1，闭盖12,000 \times g离心20秒。吸弃废液，将吸附柱重新放入收集管中。

▶加入RAW1时，避免RAW1接触吸附柱的管口。

4. 开盖，在吸附柱中加入 600 μ L AW2，闭盖 12,000 \times g 离心 20 秒。取出吸附柱，丢弃收集管，将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中。

5. 闭盖 12,000 \times g 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

6. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，加入 50 μ L 洗脱液 B 至吸附柱中心，闭盖。室温静置 3 分钟，12,000 \times g 离心 1 分钟，收集洗脱液，备用。

▶洗脱液B的使用量可以根据需要调整，但不得少于30 μ L。

▶洗脱液的使用量太少会影响提取效果。

【琼脂糖凝胶回收/PCR 产物纯化（柱式法）常见问题】

常见问题	原因	解决方案
吸附柱堵塞	凝胶未完全溶化	提高溶胶温度、延长溶胶时间、增加溶胶过程中的摇晃次数，仔细检查确保无固体琼脂糖残留。
回收/纯化产量低	1. 电泳液时间过长，导致电泳液 pH 偏碱，因此琼脂糖凝胶溶解后的颜色为橙色或紫色，并且未对 pH 值进行校正。	更换电泳液；加入 10 μ L 的 3M 乙酸钠混匀，使混合液的颜色变为黄色（类似于溶胶缓冲液的颜色）。
	2、凝胶未完全溶化	提高溶胶温度、延长溶胶时间、增加溶胶过程中的摇晃次数，仔细检查确保无固体琼脂糖残留。
	3. 回收/纯化片段过小	小于或等于 100bp 片段时，增加异丙醇的使用量。
	4. PCR 产物电泳时上样体积较小，目标条带的核酸总量较少。	使用体积较大的电泳孔，增加 PCR 产物的上样量。
	5. RAW1 中乙醇添加比例不当。	使用无水乙醇配制 RAW1，使乙醇含量达 60%。
	6. AW2 中乙醇添加比例不当。	使用无水乙醇配制 AW2，使乙醇含量达 80%。
	7. 洗脱不当	洗脱液加至膜中央，适当减少洗脱体积，可 65 $^{\circ}$ C 预热、延长室温放置时间或者进行二次洗脱。
纯度低	1. 盐离子残留	避免 RAW1 接触吸附柱上下口；增加 1 次 AW2 洗涤。
	2. 琼脂糖残留	尽可能去除不含目的片段的琼脂糖，提高溶胶温度、延长溶胶时间、增加溶胶过程中的摇晃次数，仔细检查确保无固体琼脂糖残留。
	3. 乙醇残留	最后一次洗涤后，吸附柱闭盖 12,000 \times g 再离心 3 分钟。

【说明书编制日期】 2024 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司

公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室

网 址：www.wuxi-medtech.com

联系电话：173 1562 0564（刘经理）