



## 硅胶膜型PCR 产物纯化及胶回收试剂盒

### 操作方法

#### 一、从琼脂糖中纯化/回收 DNA 片段

1. 切取含 DNA 片段的琼脂糖后捣碎，按重量/体积比 1:3（琼脂糖重量：NE 结合液的体积）加入 NE 结合液。如 200mg 琼脂糖加 600ml NE 结合液。将切取的琼脂糖捣碎有利于加速下一步凝胶的溶化
2. 50~60℃水浴 3~5 分钟，胶完全融化即可，其间可上下颠倒 2~3 次。
3. 将溶液转入离心纯化柱中，静置 5 分钟使 DNA 充分与硅胶膜结合，13,000rpm 离心 10~20 秒，倒掉收集管中的废液。适当增加 DNA 与硅胶膜结合的时间，使 DNA 与硅胶膜充分结合，能在一定程度上提高回收率。
4. 加入 500 $\mu$ l 的 80%异丙醇（或 80%乙醇）于离心纯化柱中，13,000rpm 离心 10~20 秒，倒掉收集管中的废液。
5. 重复步骤 4。
6. 13,000rpm 再次离心 1 分钟，尽量除去残余异丙醇或乙醇。
7. 将离心纯化柱置于新的离心管中，开盖放置 2~3 分钟，使乙醇挥发殆尽。一定使乙醇挥发干净，否则影响其回收率及纯度。
8. 加入 40~50 $\mu$ l 无菌 TE 溶液或超纯水，静置 3~5 分钟，使洗脱液充分将硅胶膜浸透。TE 溶液或超纯水的用量视用户对 DNA 浓度的要求而定。将 TE 或超纯水 50℃预热对提高回收率有一定帮助。
9. 13,000rpm 离心 1 分钟，管底溶液即为所需的 DNA。将 DNA 贮存于-20℃可长期保存。离心柱放入离心管中，若盖不上盖子，亦没有关系，可开盖离心。

#### 二、从溶液中回收 DNA 片段

1. 往无石蜡油的PCR 反应液或其它酶反应液（50~100 $\mu$ l）中加入 3 倍体积的NE 结合液，颠倒混匀。然后将混和液转入离心纯化柱，静置至少 5 分钟，使 DNA 充分与硅胶膜结合。13,000rpm 离心 10~20 秒，倒掉收集管中的废液。适当增加DNA 与硅胶膜结合的时间，使DNA 与硅胶膜充分结合，能在一定程度上提高回收率。
2. 加入 500 $\mu$ l 的 80%异丙醇（或 80%乙醇）于离心纯化柱中，13,000rpm 离心 10~20 秒，倒掉收集管中的废液。



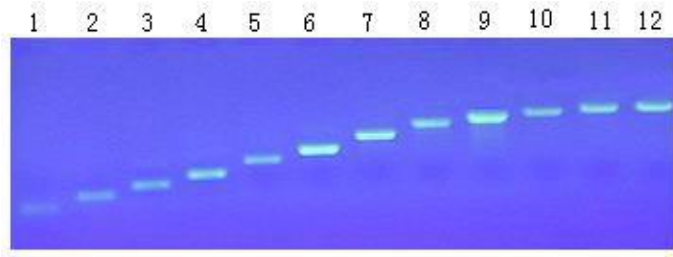
3. 重复步骤 2。
4. 13,000rpm 再次离心 1 分钟，尽量除去残余异丙醇或乙醇。
5. 将离心纯化柱置于新的离心管中，开盖放置 2~3 分钟，使乙醇挥发殆尽。一定使乙醇挥发干净，否则影响其回收率及纯度。
6. 加入 40~50 $\mu$ l 无菌 TE 溶液或超纯水，静置 3~5 分钟，使洗脱液充分将硅胶膜浸透。TE 溶液或超纯水的用量视用户对 DNA 浓度的要求而定。将 TE 或超纯水 50 $^{\circ}$ C 预热对提高回收率有一定帮助。
7. 13,000rpm 离心 1 分钟，管底溶液即为所需的 DNA。将 DNA 贮存于-20 $^{\circ}$ C 可长期保存。离心柱放入离心管中，若盖不上盖子，亦没有关系，可开盖离心。

### 常见问题及参考意见

常见问题	可能原因	参考意见
回收率低	洗脱液 pH<7.0	用 TE 或 pH>7.0 的无菌超纯水洗脱
	洗脱温度过低	加入 50 $^{\circ}$ C 温浴的无菌超纯水或 TE 浸透硅胶膜
	回收片段过大或过小	最适宜的回收片段为 150bp~5kb 对于小于 150bp 的小片段，增大 NE 结合液的比例
回收的 DNA 片段在后续实验中出现 问题（例如连接失败）	盐的浓度过高	用 80%乙醇漂洗回收产物 增加漂洗次数
	残留有有机试剂	增加离心时间，将 80%乙醇或异丙醇去除干净
	部分双链 DNA 变性为单链 DNA	在进行后续酶反应时，加入除酶以外的其它成份，95 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟，缓慢冷却至室温（25 $^{\circ}$ C 以下），使单链 DNA 重新退火为双链 DNA，然后加入酶，继续进行酶反应
		用含有 10mM NaCl 的 Tris Buffer 洗脱 DNA 片段。（注意：盐的浓度可能影响后续实验）



将约 2 $\mu$ g 的 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳后，切下 DNA 条带，然后使用本试剂盒纯化。取十分之一的量进行电泳检测，结果表明回收率达 80% 以上。



胶回收 DNA 片段电泳图

1. 胶回收的 100bp 片段
2. 胶回收的 200bp 片段
3. 胶回收的 300bp 片段
4. 胶回收的 400bp 片段
5. 胶回收的 600bp 片段
6. 胶回收的 800bp 片段
7. 胶回收的 1,200bp 片段
8. 胶回收的 1,700bp 片段

## 北京赛百盛基因技术有限公司

全国统一热线：400 666 3029

地址：北京市海淀区上地四街 1 号院 2 号楼 202 室 邮编：100085

电话：010-62969345/46, 010-82784296/92 传真：010-82784290

Email: [info@sbsbio.com](mailto:info@sbsbio.com)

<http://www.sbsbio.com>