**琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒**

**（离心柱型）**

**货号：KTSM2801**

**■ 产品简介：**

本试剂盒采用新型硅基质膜技术和独特的缓冲液系统，可从普通或低熔点琼脂糖凝胶中回收纯化70 bp-30 kb的DNA片段，同时有效去除引物、酶、矿物油和琼脂糖等杂质，溶胶速度快，回收率高。溶胶液中含有pH指示剂，可根据颜色来判断溶胶回收是否达到最佳状态。每个吸附柱可吸附高达10 μg的DNA。纯化回收的DNA纯度及浓度高，完整性好，可直接用于酶切、测序、连接和转化等分子生物学实验。

**■主要成分**：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品组成** | **50次** |
| 平衡液LB | 30 ml |
| 溶胶液PG | 25 ml |
| 漂洗液PW | 15 ml |
| 洗脱液EB | 15 ml |
| 吸附柱C2（含2 ml收集管） | 50个 |

**■保存条件**：

室温（15-25℃）

**■ 实验前准备及注意事项：**

（1）第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在漂洗液PW中加入相应的无水乙醇；

（2）使用前请检查平衡液LB是否出现浑浊，如有混浊现象，可在37℃水浴中放置3-5 min，即可恢复澄清；

（3）电泳时最好使用新的电泳缓冲液，避免影响电泳和回收效果；如下一步实验要求较高，请尽量使用TAE电泳缓冲液；

（4）切胶时，紫外照射时间应尽量短，以免对DNA造成损伤；

（5）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；

（6）溶胶液PG中含有pH指示剂，如溶液的颜色变成棕黄色或紫红色，可向溶胶液PG中加入乙酸进行调节；

（7）所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下进行。

**■ 操作步骤：**

（1）在紫外灯下快速将目的DNA条带从琼脂糖凝胶中切下，放入干净的离心管中，称量计算凝胶重量；

（2）向胶块中加入1倍体积的溶胶液PG（如凝胶重为100 mg，其体积可视为100 μl，依此类推。若胶块的体积过大，可用枪头将胶块捣成碎块）；

（3）50℃水浴放置约10 min，其间每隔2-3 min温和地上下颠倒离心管，确保胶块充分溶解。如果还有未溶的胶块，可继续放置几分钟或再补加一些溶胶液直至胶块完全溶解；

**注意：由于在室温下吸附柱与DNA的结合能力较强，建议将胶块溶解后的溶液温度降至室温再上柱**。

（4）柱平衡：向吸附柱中加入500 μl平衡液LB，12,000 rpm离心1 min，弃收集管中滤液，将吸附柱放入收集管中；

（5）将步骤3所得的溶液加入到吸附柱中，室温放置2 min，12,000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中；

**注意：若溶液体积大于750 μl可分批加入。**

（6）向吸附柱中加入600 μl漂洗液PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中；

**注意：如果纯化的DNA用于平末端连接或直接测序等盐敏感实验，建议加入漂洗液PW后静置2-5 min再离心。**

（7）重复步骤（6）；

（8）空柱12,000 rpm离心2 min；室温放置3-5 min，除去残留乙醇；

**注意：漂洗液中的乙醇会影响后续PCR或酶切等酶促反映，此处应尽量晾干残留的漂洗液。**

（9）将吸附柱放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位滴加50-100 μl洗脱缓EB，室温放置1 min，12,000 rpm离心2 min洗脱DNA，可立即用于下游分子生物学实验或-20℃保存。

**注意：洗脱体积不应少于30 μl，体积过小会影响回收效率。将洗脱得到的溶液重新加入吸附柱中，重复步骤9可增DNA回收量。若后续做测序，酶切等实验需使用ddH2O做洗脱液。**

**备注：本试剂盒也适用于PCR产物的纯化回收。在PCR反应液中加入等体积的溶胶液PG，充分混匀（对于回收小于150 bp的小片段可将溶液的体积增加到3倍以提高回收率）接上述步骤4进行后续操作。**