

2. 结合液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。
3. 回收纯化的 DNA 片段一般在 100bp 到 50kb 之间,过长,过短片段的回收效率迅速降低。
4. 回收的 DNA 量和起始 DNA 的量,洗脱体积, DNA 片断大小有关。一般 5-25 $\mu$ g,大小为 100bp-5kb 的 DNA 片段,回收率可达 85%—95%。
5. 切胶回收时,紫外灯观察对 DNA 片段有损坏作用,应该尽可能使用能量低的长波紫外线,并且尽可能的缩短紫外线下处理的时间。
6. pH 值 $\leq$ 7.5 时吸附膜吸附 DNA 的效率最高,如果切下来的凝胶中含有电泳缓冲液太多造成溶胶后溶胶液 pH 偏高,会导致回收率降低。溶胶以后如果溶胶液依旧保持黄色,说明 pH 正常。如果变成橘红色或者淡紫色说明 pH 偏高,可在胶充分溶解后加 5-10 $\mu$ l 左右 3M 醋酸钠 (pH5.2) 将 pH 值调到 5-7 之间 (黄色)。
7. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA,不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱,但应该确保 pH 大于 7.5, pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱 DNA 片段应该保存在-20 $^{\circ}$ C。DNA 片段如果需要长期保存,可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, PH 8.0),但是 EDTA 可能影响下游酶切反应,使用时可以适当稀释。

## 五、操作步骤

\* 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 60ml 无水乙醇!

(一)、以下为 PCR 产物或者酶切片段等 DNA 纯化操作步骤。

1. 每 100 $\mu$ l PCR 扩增后体系或者酶切后体系加入 500 $\mu$ l 结合液 DB,充分混匀。(如果初始体系小于 100 $\mu$ l,请事先用双蒸水调整至 100 $\mu$ l)。
2. 将上一步所得溶液加入吸附柱 AC 中 (吸附柱放入收集管中),室温放置一分钟,12,000 rpm 离心 30-60 秒,倒掉收集管中的废液。
3. 加入 700 $\mu$ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!),12,000 rpm 离心 1 分钟,弃掉废液。
4. 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB 12,000 rpm 离心 1 分钟,弃掉废液。
5. 将吸附柱 AC 放回空收集管中,12,000 rpm 离心 2 分钟,尽量除去漂洗液,以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
6. 取出吸附柱 AC,放入一个干净的离心管中,在吸附膜的中间部位加 50 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好),室温放置 2 分钟,12,000 rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量 DNA,可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中,离心 1 分钟。  
洗脱体积越大,洗脱效率越高,如果需要 DNA 浓度较高,可以适当减少洗脱体积,但是最小体积不应少于 30 $\mu$ l,体积过小降 DNA 洗脱效率,减少产量。

## 六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
核酸产量低或者纯度不高	试剂盒储存在非最佳条件	收到试剂盒后总是存放在室温 (15°C–20°C)
	缓冲液或者试剂暴露于减少它们有效性的条件下	储存在室温 (15°C–20°C) 每次用完后立刻盖紧盖子, 以免溶液蒸发, PH 改变和污染。
	漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇	<b>第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</b>
	试剂和要回收溶液如 PCR 产物没有充分混匀	加入每个试剂后都要充分混匀
洗脱后回收率低	使用了非最佳的洗脱液, 洗脱液的高 PH 非常重要	不要用水洗脱, 用试剂盒带的洗脱液 EB.
回收后 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	忘记做步骤 5, 乙醇抑制了酶切反应	做步骤 5, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。
	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应	将洗脱的回收 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用,
纯化的 DNA 产物 OD <sub>260</sub> 数值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了分光光度计读数	将洗脱的回收 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用,
洗脱液中不含 DNA	在初始处理材料中没有 PCR 产物	开始回收前, 用琼脂糖凝胶/EB 电泳检测 PCR 产物。

## 二、原理简介

在高离序盐存在的条件下, DNA 片断选择性的吸附于离心柱内的硅基质膜上, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤去蛋白液和漂洗液将引物, 核苷酸, 蛋白酶等杂质去除, 最后低盐, 高 PH 值的洗脱缓冲液将纯净 DNA 从硅基质膜上洗脱。

## 三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 使用了优质结合液, 不含传统溶胶液的碘化钠和高氯酸盐, 不抑制回收后酶切、连接克隆等下游反应。
3. 结合液调制成为了黄颜色, 便于观察溶胶效果和监测 PH 值变化。
4. 快速、方便, 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀。

## 四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机, 如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。