

**GF-1 凝胶及 PCR 产物双效回收试剂盒说明书**

版本 2.1

**产品简介:**

GF-1 凝胶及PCR产物双效回收试剂盒，用于从琼脂糖凝胶中回收DNA并快速纯化 100bp~20kb的DNA条带。试剂盒含有特殊的缓冲液，以提供合理的盐浓度和pH值，有效回收PCR产物和琼脂糖凝胶中 80%-90%的DNA。本试剂盒采用一个经特殊处理的玻璃纤维滤膜固定到柱子中，在高盐下有效地结合DNA。试剂盒应用核酸纯化柱技术，适用于去除多余的dNTPs，短寡核苷酸片段，矿物油，PCR产物中的酶，酶切处理后的蛋白质、脱磷酸、残余染料和溴化乙锭。此试剂盒也适用于浓缩DNA，改变缓冲液和脱盐。以高回收率获取的纯DNA可随时用于许多常规分子生物学实验，如酶切，放射性或荧光DNA测序，PCR，连接和转化，探针制备和其他操作。

**试剂盒组成成份**

	5 次	25 次	100 次	200 次
产品目录号	样品	CN/GF-GC-025	CN/GF-GC-100	CN/GF-GC-200
<b>组份</b>				
GF-1 亲和柱(GF-1 columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	5	25	100	200
DNA 结合缓冲液 (缓冲液 DB) DNA Binding Buffer (Buffer DB)	5ml	15ml	60ml	2 x 60ml
洗涤液 (浓缩液) * Wash Buffer(concentrate)*	2.4ml	9ml	34ml	2 x 34ml
洗脱液 (Elution Buffer)	1.5ml	5ml	20ml	30ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意：标\*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

**GF-1 凝胶及 PCR 产物双效回收试剂盒**有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

**自备材料**

无水乙醇 (>95%)

**配制方案**

贴有洗涤液标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

**样品 (5 次)**

在洗涤液中加入 5.6ml 无水乙醇。

**CN/GF-GC-025 (25 次)**

在洗涤液中加入 21ml 无水乙醇。

**CN/GF-GC-100 (100 次)**

在洗涤液中加入 80ml 无水乙醇。

**CN/GF-GC-200 (200 次)**

在洗涤液中加入 80ml 无水乙醇。使用完后再以同样的方法稀释第二瓶洗涤液。

洗涤液使用后拧紧瓶盖，室温保存。

**储存及稳定性**

● 溶液 20°C-30°C 保存。

● 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存12个月。缓冲液 DB 在室温过低时易出现结晶，使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

**化学危害**

缓冲液 DB 含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中来进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水中来即可除去胍盐。

**操作步骤****提示**

- 所有操作均在室温下进行，除非另有说明。
- 洗涤液浓缩液在使用前务必用无水乙醇稀释，请参照**配制方案**。
- 如果缓冲液 DB 出现沉淀或结晶，请置于 55 °C-65 °C 环境中至晶体完全溶解。
- 为每500 μl PCR 产物或每 0.5g 琼脂糖凝胶纯化提供了足够数量的缓冲液 DB，在缓冲液 DB 不足的情况下，请单独购买所需的额外的缓冲液。

**I、样品制备****A、琼脂糖凝胶DNA回收****1、凝胶电泳**

琼脂糖凝胶电泳分离DNA片段，进行溴化乙锭染色使DNA可视化。剪切含有目的DNA的琼脂糖凝胶带，并将其放置到一个预先称重的微量离心管中。

**注：确保在剪切凝胶条带前，已进行充分的凝胶电泳。避免让DNA受到超过 30 秒的紫外线照射。**

**2、琼脂糖的溶解**

确定凝胶片的净重，加入 1 倍体积的缓冲液DB到 1 体积的凝胶中（一个质量 0.1g的凝胶片相当于 100 μl体积），短暂离心使凝胶片留在管底部，50°C温育直到凝胶全部融化。偶尔混合确保琼脂糖完全溶解。

对于长度为 400bp~4kb的DNA片段，加入 1 凝胶体积的无水乙醇使之溶解，充分混匀。

**3、进行第二步DNA纯化****B、PCR纯化****1、凝胶电泳**

如有需要，进行琼脂糖凝胶电泳确认DNA条带。

**2、均质化**

确定样本量，用无菌蒸馏水调整至 100ul，样本体积超过 100ul 可直接使用。在样本中加入 1 倍体积的缓冲液DB，漩涡振荡充分混匀或颠倒混匀数次。

对于长度为 400bp~4kb的DNA片段，在样本中加入 1 倍体积的无水乙醇，充分混匀。

**注：如果PCR产物初始体积是 100ul，则加入 100ul的无水乙醇。**

**3、进行第二步DNA纯化****II、DNA纯化**

## 1、装载到亲和柱

将样品转移到一个带有干净收集管的柱子中，10,000 x g (11,000rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。重复操作步骤 2 中的剩余样本。

## 2、柱子洗涤

加入 650ul 洗涤液，10,000 x g (11,000rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

注：使用前确保洗涤液已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。

## 3、柱子干燥

10,000 x g (11,000rpm) 离心柱子 1 分钟，除去残留乙醇。

注：这个步骤是为了完全除去所有残留乙醇，因为残留乙醇会影响 DNA 质量，还可能抑制后续的酶反应。

## 4、DNA 洗脱

将亲和柱放入一干净的微量离心管中，取 30-200ul 洗脱液，TE 缓冲液或无菌水直接加到亲和柱的膜中央，室温静置 2 分钟，对于超过 8kb 的 DNA 片段，使用 65 °C - 70 °C 预热洗脱液，洗脱效果更好。10,000 x g (11,000 rpm) 离心 1 分钟，以洗脱 DNA。DNA 4°C 或 -20°C 保存。

注：对于较高浓度的 DNA，在较小体积里洗脱下来，如 30ul，得率会略有减少。确保洗脱液被直接加入到膜中央以完全洗脱 DNA。TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制后续的酶反应，但仍可洗脱 DNA。如果用水洗脱 DNA，PH 7.0-8.5 时洗脱效果最好。当没有缓冲剂存在的情况下，DNA 可能降解，此时 DNA -20°C 保存。

## 故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 DNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

问题	可能的原因	建议
凝胶片不溶解	使用高浓度凝胶	延长温育时间，并搅拌均匀直到凝胶片全部溶解。
	凝胶片太大	去除多余的凝胶并将凝胶切成小片以增强溶解效果。
DNA 回收率低	DNA 不完全洗脱	洗脱液与膜充分接触，被直接分配到膜中央。洗脱液不要少于 30ul。
	不正确的洗脱液	确保所用洗脱液为低盐缓冲液或 pH 为 7.0-8.5 的水。
	TAE 或 TBE 缓冲液反复使用或 pH 值不正确	通常，反复使用的 TAE 或 TBE pH 值会增大。最好使用新鲜的 TAE 或 TBE 进行凝胶电泳。
	在电泳、染色和脱色过程中，DNA 扩散或释放到缓冲液中	在电泳过程中缩短 DNA 移动距离。电泳过程中不要用太多的缓冲液覆盖凝胶。缩短染色和脱色时间。
长度小于 400bp 的 DNA 回收率低	高温会导致 DNA 变成单链 DNA	40°C 溶解琼脂糖，加长溶解时间，反复混匀。
	由于 DNA 太短，结合效率降低	装载到柱子之前在样品中加入 1 凝胶体积的异丙醇。

问题	可能的原因	建议
长度超过 8kb 的 DNA 回收率低	洗脱效果差	65°C - 70°C 预热洗脱液。
	由于 DNA 较大，结合效率降低	样品装载到柱子之前加入 1 凝胶体积的异丙醇。
没有被洗脱的 DNA	洗脱液不正确	参照问题“DNA 回收率低”。
洗脱的 DNA 中含有非特异性 DNA 片段	电泳过程中，条带移动距离不足	在切胶之前确保已进行充分的凝胶电泳使条带分离。
	所用刀片曾切除过被其他 DNA 片段污染的凝胶	使用一新的刀片切胶。
洗脱的 DNA 在下游应用中性能差	洗脱下来的 DNA 含有残留乙醇	确保在洗脱之前柱子已进行离心干燥。
	用 TE 缓冲液来洗脱 DNA。TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制后续的酶反应。	用洗脱液或 pH 为 7.0-8.5 的水洗脱 DNA。

## 上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话：021-68060114

传真：021-68060114

邮箱：info@kestrel-china.com

网址：www.kestrel-china.com

## Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivanttechnologies.com

international@vivanttechnologies.com

Web: www.vivanttechnologies.com