**FastPure FastPure Gel and PCR Purification Kit Handbook**

**通用型 DNA纯化回收试剂盒（胶与PCR纯化）（离心柱型）**

**产品组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **FastPure Gel Extraction Kit** | | |
| **产品编号** | EK-1104-50T | EK-1104-100T |
| **纯化次数** | 50次 | 100次 |
| **Buffer QG** | 30ml | 60ml |
| **Buffer PB** | 30ml | 60ml |
| **Buffer PW** | 12ml | 24ml |
| **Buffer EB** | 10ml | 20ml |
| **Gel Spin Columns** | 50 | 100 |
| **2ml Collection Tubes** | 50 | 100 |
| **使用手册** | 1 | 1 |

**产品介绍**

本试剂盒采用可高效、专一结合DNA的硅基质材料和独特的缓冲液系统，可从各种浓度的TAE或TBE琼脂糖凝胶上回收70bp-10kbp大小的DNA片段，也可以用于各种PCR体系中DNA回收，同时除去蛋白质、其它有机化合物、无机盐离子及寡核苷酸引物等杂质，回收率可达80%以上。每个离心吸附柱每次可吸附的DNA量为20μg。使用本试剂盒回收的DNA可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、文库筛选、连接和转化等实验。

**存储条件**

该试剂盒置于室温（15-25℃）干燥条件下，可保存12个月。Buffer QG/PB可能产生沉淀，若有沉淀使用前可在55℃水浴中预热10 min以溶解。

**需要额外准备的材料**

□ 无水乙醇（96%-100%）

□ 无菌1.5ml离心管

**开始前注意事项** **请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。**

* 电泳时最好使用新的电泳缓冲液，以免影响电泳和回收效果。
* 如下一步实验要求较高，核酸电泳时则应尽量使用TAE电泳缓冲液。
* 切胶时，紫外照射时间应尽量短，以免对DNA造成损伤。
* 如果回收率较低，可在胶充分溶解后检测pH值，如pH值大于7.5，可向含有DNA的胶溶液中加10-30µl 3M醋酸钠（pH5.2）将pH值调到5-7之间。
* 回收<70bp或>10kbp的DNA片段时，应加大Buffer QG的体积，延长吸附和洗脱时间。
* 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。
* 高温及潮湿等不利环境因素对吸附柱产生影响，请将吸附柱储存于阴凉干燥的环境中。

**开始前试剂准备**

* 按瓶子标签所示，加入4倍体积的无水乙醇稀释Buffer PW，于室温密封保存。
* 确认Buffer QG溶液显示为黄色。

**DNA浓度及纯度检测**

* 回收得到的DNA片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。
* DNA应在OD260处有显著吸收峰，OD260值为1相当于大约50μg/ml双链DNA、40μg/ml单链DNA。
* OD260/OD280比值应为1.7-2.0，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用ddH2O比值会偏低，因为pH值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

**操作步骤：**

**一、琼脂糖回收DNA**

1. **配制所需浓度的琼脂糖凝胶，电泳分离DNA片段。当DNA片段分离后，将凝胶置于紫外灯下，用干净锋利的手术刀快速切下含目的片段大小的DNA凝胶。**

为避免DNA片段受到损伤，应尽量减少凝胶的紫外照射时间，切胶时应尽量切去多余凝胶。

1. **放入1.5ml离心管中并称取凝胶块的重量，加入3倍体积的Buffer QG（如凝胶称重结果为100mg，则其体积约等于100µl，应加入300µl Buffer QG）。**

对于>2%的琼脂糖凝胶，添加6倍体积的Buffer QG。

1. **50℃水浴10min（或直至凝胶完全溶解即可），水浴期间可颠倒混匀加速溶胶。**

注意：若回收<300bp的DNA片段可在完全溶胶后加入一倍凝胶体积的异丙醇以提高回收率；胶块完全溶解后最好将溶液温度降至室温再上柱，因为吸附柱在室温时结合DNA能力较强。

1. **凝胶完全溶解后，检查颜色是否为黄色（类似于没有溶解琼脂糖的Buffer QG）。**

如果混合物的颜色为橙色或紫色，则加入10µl 3 M 醋酸钠(pH 5.0)并混合，混合物的颜色会变成黄色。DNA吸附到膜上仅在pH ≤ 7.5时有效。Buffer QG含有一种pH指示剂，在pH ≤7.5时为黄色，在较高pH时为橙色或紫色，可通过颜色轻松确定DNA结合的最佳pH。

1. **将吸附柱套在2ml收集管中，并将上一步得到的溶液加入到吸附柱中，≥8000×g (≥10,000 rpm)离心30s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。**
2. **向吸附柱中加入500µl Buffer PW（已加入无水乙醇），≥8000×g(≥10,000 rpm)离心30s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。**

注意：如果回收的DNA是用于盐敏感的实验，例如平末端连接实验或直接测序，建议加入Buffer PW后静置2-5min后再离心。

1. **重复操作步骤7一次。**
2. **倒掉收集管中的废液后将吸附柱再次套入收集管中，最大转速 (~13,400×g)离心2min以干燥吸附柱膜，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。将吸附柱套入新的1.5ml 离心管中并于室温开盖放置5-10min彻底晾干。**

注意：Buffer PW中的乙醇残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

1. **向吸附柱膜中央位置悬空滴加30-50µl Buffer EB，盖上盖子室温静置2min后，最大转速 (~13,400×g)离心2min收集DNA溶液并置于-20℃保存。**

注意：洗脱体积不应小于30μl，体积过少影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用ddH2O做洗脱液，并保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。为了提高DNA的回收量，可重复操作步骤10一次。

**二、从PCR反应液或者酶切反应中回收DNA**

1. **将5倍体积的Buffer PB添加到1倍体积的PCR样品中，然后混匀。**

例如，将500µl Buffer PB添加到100µl PCR样品（不包括油的体积），无需去除石蜡油或矿物油。

1. **溶液完全溶解后，检查颜色是否为黄色。**

如果混合物的颜色为红色，则加入10µl 3 M 醋酸钠(pH 5.0)并混合，混合物的颜色会变成黄色。DNA吸附到膜上仅在pH ≤ 7.5时有效。Buffer PB含有一种pH指示剂，在pH ≤7.5时为黄色，在较高pH时为红色，可通过颜色轻松确定DNA结合的最佳pH。

1. **将吸附柱套在2ml收集管中，并将上一步得到的溶液加入到吸附柱中，≥8000×g (≥10,000 rpm)离心30s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。**
2. **向吸附柱中加入500µl Buffer PW（已加入无水乙醇），≥8000×g (≥10,000 rpm)离心30s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。**

注意：如果回收的DNA是用于盐敏感的实验，例如平末端连接实验或直接测序，建议加入Buffer PW后静置2-5min后再离心。

1. **重复操作步骤4一次。**
2. **倒掉收集管中的废液后将吸附柱再次套入收集管中，最大转速 (~13,400×g)离心2min以干燥吸附柱膜，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。将吸附柱套入新的1.5ml离心管中并于室温开盖放置5-10min彻底晾干。**
3. **向吸附柱膜中央位置悬空滴加30-50µl Buffer EB，盖上盖子室温静置2min后，最大转速 (~13,400×g)离心2min收集DNA溶液并置于-20℃保存。**