

## FastPure FastPure Gel and PCR Purification Kit Handbook 通用型 DNA 纯化回收试剂盒（胶与 PCR 纯化）

### 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 20 $\mu$ g。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 $^{\circ}$ C）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 $^{\circ}$ C 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 的胶溶液中加入 10-30 $\mu$ L 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 50 $\mu$ g/mL 双链 DNA、40 $\mu$ g/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 ddH<sub>2</sub>O 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。

2. 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 100 $\mu$ L，应加入 300 $\mu$ L Buffer QG）。

对于>2%的琼脂糖凝胶，添加 6 倍体积的 Buffer QG。

3. 50°C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。

4. 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，则逐滴加入 10-30 $\mu$ L 3 M 醋酸钠(pH 5.2)并混合，直到混合物颜色变成黄色。DNA 吸附到膜上仅在 pH  $\leq$  7.5 时有效。Buffer QG 含有一种 pH 指示剂，在 pH  $\leq$  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。

5. 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， $\geq$ 8000 $\times$ g ( $\geq$ 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。

7. 重复操作步骤 6 一次。
8. 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 $\times$ 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。将吸附柱移入新的 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。

9. 向吸附柱膜中央位置悬空滴加 30-50 $\mu$ L Buffer EB，盖上盖子室温静置 2min 后，最大转速 (~13,400 $\times$ g)离心 2min 收集 DNA 溶液并置于-20°C保存。

注意：洗脱体积不应小于 30 $\mu$ L，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 ddH<sub>2</sub>O 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，可重复本洗脱步骤一次。

**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 500 $\mu$ L Buffer PB 添加到 100 $\mu$ L PCR 样品（不包括油的体积），无需去除石蜡油或矿物油。

2. Buffer PB 与样品充分混匀后，检查颜色是否为黄色。

如果混合物的颜色为橙色或紫色，则逐滴加入 10-30 $\mu$ L 3 M 醋酸钠(pH 5.2)并混合，直到混合物颜色变成黄色。DNA 吸附到膜上仅在 pH  $\leq$  7.5 时有效。Buffer PB 含有一种 pH 指示剂，在 pH  $\leq$  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。

3. 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， $\geq$ 8000 $\times$ g ( $\geq$ 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。

4. 向吸附柱中加入 500 $\mu$ L Buffer PW（已加入无水乙醇）， $\geq$ 8000 $\times$ g ( $\geq$ 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。

5. 重复操作步骤 4 一次。

6. 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 $\times$ 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。将吸附柱移入新的 1.5mL 离心管中并于室温开盖放置 5-10min 彻底晾干。

7. 向吸附柱膜中央位置悬空滴加 30-50 $\mu$ L Buffer EB，盖上盖子室温静置 2min 后，最大转速 (~13,400 $\times$ g)离心 2min 收集 DNA 溶液并置于-20°C保存。