

AFT Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒

| 产品名称 | 单位 | 货号 |
|------------------------|-----|------------|
| AFT Gel Extraction Kit | 50T | AFT2013-01 |

【储存条件】

常温运输，室温（15~30℃）保存，保质期一年。如需长期保存，可将各试剂组分置于 2~8℃，使用时如发现结晶，可于 37~55℃ 水浴加热助溶。离心吸附柱不建议低温或大于 30℃ 保存，否则可能影响吸附效率。

【产品简介】

AFT 胶回收试剂盒利用硅基质材料在高盐缓冲系统对 DNA 高效、专一吸附的原理，配备 AFT 自主研发的膜结合液（又称溶胶液）和高性能的硅胶膜离心吸附柱，可在 15 分钟内清除凝胶、核酸染料及其他杂质，高效回收 DNA 片段。本试剂盒配套的膜结合液和离心吸附柱的最大吸附量为 20μg，对 100 bp~10 kb 线性双链 DNA 片段的回收效率可高达 50~90%，也可用于单链 DNA 片段和质粒 DNA 的纯化。因回收率受 DNA 片段大小、浓度等因素的综合影响，故应尽量加大电泳的 DNA 片段浓度，以提高回收率。回收后的 DNA 片段可以直接用于酶切、连接、测序、标记、杂交和体外转录等多种分子生物学实验。

【回收效率】

| 线性 DNA 片段大小 | 回收效率 |
|-----------------|--------|
| 50 bp | 30~50% |
| 100 bp ~ 200 bp | 50~70% |
| 200 bp ~ 5 kb | 70~90% |
| 5 kb ~ 10 kb | 50~70% |

【产品组份】

| | 50T | 注意事项 |
|-----------|------|----------------------------|
| 膜结合液（MB） | 25ml | |
| 膜漂洗液（MW） | 15ml | 初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀 |
| 洗脱缓冲液（EB） | 10ml | |
| 平衡液（BL） | 25ml | 请使用当天平衡液处理过的吸附柱 |
| 离心吸附柱及收集管 | 50 套 | 室温密闭干燥保存 |

初次使用本试剂盒，请按瓶标说明向膜漂洗液（MW）中加入相应体积的无水乙醇（用户自备），并在试剂瓶上做标记。

【实验准备】 用户需自行准备的材料：含 DNA 样品的琼脂糖凝胶，无水乙醇，异丙醇，55℃ 水浴，切胶设备，台式离心机。

【操作步骤】

柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 400 μl 的平衡液 BL，12,000 rpm (-13,400×g) 离心 1 min，弃收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

（请大家别嫌这步麻烦，它是为了盒子放置时间长不用，处理一下效果如新，减少浪费。如果新开封马上用，可以不做柱平衡）

1. **切胶。**用干净刀片将目的 DNA 条带切下，尽量切除不含 DNA 的凝胶。

注意：紫外线对 DNA 片段有损坏作用，切胶要迅速，避免长时间照射，同时做好眼睛及皮肤的防护。

2. **称重。**将切下的含有目的 DNA 条带的凝胶切成小块，放入 1.5 ml 塑料离心管中，称重。

注意：先称一个空的 1.5 ml 塑料离心管的重量，然后放入凝胶块再称一次，两次重量相减得到凝胶的重量。

3. **溶胶。**加入等体积膜结合液（MB），60℃水浴，每隔 2 ~ 3 min 上下振荡，直到凝胶完全溶解。

注意：如凝胶重量为 100 mg，其体积可视为 100 ul，则加入 100 ul 膜结合液；如凝胶浓度大于 2%，所用膜结合液体积加倍；对于**回收<300 bp 的小片段或者大于 3000bp 的大片段**，**必须**在凝胶完全溶解后再加入 1/2 胶块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 的能力较强。

4. **吸附。**待溶液冷却后加入离心吸附柱中，室温静置 2 min，让 DNA 片段与吸附柱中的硅胶膜充分结合，然后 12,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中滤液。

注意：如总体积超过 750 ul 可分 2 次将溶液加入同一离心吸附柱中；为增加目的 DNA 片段的洗脱浓度，也可将多管溶液加入到同一离心吸附柱中。

5. **清洗。**加入 600 ul 的膜漂洗液 (MW)，12,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中废液。

注意：膜漂洗液 (MW) 按要求加入乙醇，用后应立即盖紧瓶盖，以防酒精挥发；如后续实验要求纯度较高，可再清洗一次。

6. **干燥。**将离心吸附柱于 12,000 rpm 离心 2 min，甩干残留漂洗液。

注意：此步不能省略，否则残留乙醇会影响后续实验。

7. **洗脱。**将离心吸附柱置于一个新的 1.5 ml 塑料离心管中，在吸附柱中央加入 30 ~ 50 ul 洗脱缓冲液 (EB)，室温放置 2 min。12,000 rpm 离心 1 min 收集 DNA 片段。

注意：为增加回收效率，可将洗脱液在 60°C 预热，也可将得到的溶液重新加入到离心管中，室温放置 2 min，再次离心收集。如需使用去离子水洗脱，可用 NaOH 调整其 pH 值在 7.0 ~ 8.5 之间)。

【常见问题及解决方案】

| 问题 | 可能原因 | 解决方案 |
|-------------|-------------------------------|--|
| 回收效率低 | 膜结合液 (MB) 使用量不当 | 按每 1 mg 凝胶或每 1 μl DNA 溶液加入 1 μl 膜结合液的比例 (1:1) 加入膜结合液 |
| | 溶胶不完全 | 尽量将胶切成小块，加入膜结合溶液后于 55~65°C 加热助溶，确保溶胶彻底 |
| | 离心力不足，DNA 未与硅胶膜充分结合 | ≥12,000 rpm 离心，如果离心机达不到该转速，可适当延长离心时间以确保胶溶液完全通过硅胶膜 |
| | 膜漂洗液 (MW) 未添加乙醇 | 第一次使用时按比例添加乙醇，并在试剂瓶上做标记 |
| | 洗脱溶液 pH 值不合适 | 使用试剂盒提供的洗脱缓冲液 (EB)；如用去离子水洗脱，需将 pH 值调至 7.0~8.5 范围 |
| | 洗脱溶液体积过小 | 使用 30 μl 以上洗脱溶液，加至硅胶膜的中央，静置 1 分钟，使膜完全浸润后再离心 |
| 回收产物测序结果不佳 | 用量太低 | 提高测序反应使用的 DNA 量；如果回收产物浓度过低，可通过乙醇沉淀浓缩产物 |
| | 用量过高，干扰测序结果 | 降低 DNA 用量，必要时用 EB 或灭菌双蒸水进行稀释 |
| | TE 缓冲液干扰测序结果 | 使用无 DNA 酶污染的洗脱缓冲液 (EB) 或灭菌双蒸水溶解 DNA 作为测序模板 |
| | 紫外线下暴露时间过长 | 切胶动作要快，尽量减少紫外线照射的时间 |
| 酶切效果不佳 | 酶的质量低劣或使用方法不当 | 按照厂家说明书正确使用酶；设立阳性对照检测内切酶活性 |
| | 膜漂洗液 (MW) 去除不彻底，胶回收产物中残留有乙醇或盐 | 再次乙醇沉淀回收，并确保 DNA 溶液体积不高于酶切反应总体积的 10% |
| 电泳上样时漂出上样孔 | 未添加上样缓冲液 | 与适量上样缓冲液混合后上样 |
| | 膜漂洗液 (MW) 去除不彻底，胶回收产物中残留有乙醇 | 确保洗涤步骤中洗涤缓冲液去除彻底，可增加离心时间或开盖放置一段时间使残留乙醇挥发 |
| 回收产物电泳条带不锐利 | DNA 分子断裂 | 切胶、混合等操作尽量小心，特别是大片段，应避免 DNA 因机械损伤而断裂 |
| | 其他 DNA 分子污染 | 使用新配制的琼脂糖凝胶和电泳缓冲液，刀片应保持清洁，以避免 DNA 交叉污染 |
| | DNA 分子降解 | 切下来的胶块如不能及时回收，应于 4°C 保存，避免 DNA 降解 |
| 克隆效率低 | 离心吸附柱漂洗不彻底 | 再次乙醇沉淀回收 |
| | 回收过程中有外切酶污染，导致 DNA 片段末端序列缺失 | 用新鲜配制的胶和电泳缓冲液进行电泳；胶回收保证无菌操作 |
| | 感受态细胞的效率差 | 确保感受态制备和保存方法正确 |

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。