

【产品概述】

本试剂盒使用精心配制的溶胶&结合缓冲液结合博岳自产优异磁珠，可以快速、高效地从 PCR 产物或琼脂糖凝胶中回收 100 bp-15 kb 的 DNA 片段。通过磁珠特异性吸附核酸分子，结合洗涤步骤去除其他杂质，得到高纯度的 DNA 可用于酶切、连接、测序等后续分子生物学试验。

【产品组分】

组分	M1PG01-01 (50 次)	M1PG01-02 (200 次)
溶液 I	25 mL	100 mL
溶液 II*	12 mL*	48 mL*
溶液 III	8 mL	30 mL
磁珠	1 mL	4 mL

*首次使用时，按照说明书及瓶身提示在溶液 II 瓶中加入指定体积的无水乙醇：M1PG01-01 加入 48 mL 无水乙醇；M1PG01-02 加入 196 mL 无水乙醇。

【储存和运输】

常温运输，室温保存（15-25℃），产品有效期 1 年。

【注意事项】

- 自备无水乙醇、异丙醇（小片段回收）等试剂和磁力架、水浴锅/金属浴、离心管等设备耗材。
- 溶液 I 有一定刺激性，操作过程应注意采取适当的防护措施，如工作服、手套、护目镜等。
- 第一次使用前在溶液 II 中加入指定体积的无水乙醇（乙醇终浓度为 80%），充分混匀并在瓶上做好标记。
- 可以使用去离子水、Low TE 溶液或 TE 溶液代替溶液 III 进行洗脱，使用去离子水时其 pH 不应低于 7。
- 磁珠悬液在静置后会发生沉降，使用前充分涡旋或震荡混匀。
- 可根据目的片段的丰度、PCR 产物体积、切取凝胶块的体积等适当调整磁珠用量以获取最佳产物回收效率。
- 试剂盒对小于 200 bp 或大于 5 kb 的 DNA 片段的回收率会稍有降低，建议增加 PCR 扩增体积或凝胶电泳时的上样量。



【实验操作】

一、从 PCR 产物中回收 DNA 片段

1. 将 PCR 产物 ($\geq 20 \mu\text{L}$) 转移至新的 1.5 mL 离心管 (自备) 中, 并加入 $1\times$ PCR 产物体积的溶液 I (例如 $50 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物中加入 $50 \mu\text{L}$ 溶液 I)。
2. 如果回收片段小于 400 bp, 在上述混合液中加入 $1\times$ PCR 产物体积的异丙醇 (自备) 以提高目标片段回收率。
3. 加入 $20 \mu\text{L}$ 充分涡旋混匀的磁珠悬浮液, 吹打或涡旋混匀后室温静置 5 min, 期间手动或涡旋混匀 1-2 次。
4. 将离心管置于磁力架上静置 1-2 min, 确保所有磁珠被吸附溶液澄清, 吸弃上清, 保留磁珠。
5. 加入 $600 \mu\text{L}$ 溶液 II (确保已经按要求加入规定体积的无水乙醇), 涡旋混匀 1 min。
6. 将离心管置于磁力架上静置 1-2 min, 确保所有磁珠被吸附溶液澄清, 吸弃上清, 保留磁珠。
7. 【可选】重复步骤 5-6, 再次洗涤磁珠。
8. 保持离心管在磁力架上, 室温晾干 3-5 min, 去除乙醇残留。【注意】不能使磁珠过分干燥, 否则可能会显著降低 DNA 回收率。
9. 在离心管中加入 $30-50 \mu\text{L}$ 经 65°C 预热的溶液 III, 充分吹打或涡旋混匀, 静置 2 min。

【可选】将离心管 65°C 孵育 10 min, 期间吹打或涡旋混匀数次, 以获得最佳洗脱效率。
10. 将离心管置于磁力架上静置 1-2 min, 确保所有磁珠被吸附, 转移洗脱液到新的无核酶离心管中。回收产物可以直接用于下游应用或者 -20°C 保存备用。



二、从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段

1. 使用干净、锋利的刀片小心从琼脂糖凝胶中切下含目的片段的胶块(尽量去除不含目的片段的多余凝胶)，放入已称重的新的离心管中，再次称重，并计算凝胶重量。
2. 向离心管中加入 **2×凝胶体积**的**溶液 I** (每 100 mg 凝胶视为 100 μL ，需加入 200 μL 溶液 I) ，50°C 孵育至凝胶完全溶解。若琼脂糖凝胶浓度较高(如 2%)，可以适当增加溶液 I 的用量。完全溶解后应呈现为均匀透明像溶液 I 一样的黄色。若此时溶液为淡紫色(非透明黄色)，需加入适量的 3M NaAc pH5.2 (自备) 至溶液变成透明黄色。
3. 如果回收片段小于 400 bp，在凝胶完全溶解后，继续加入 **1×凝胶体积**的**异丙醇** (自备) 以提高回收率。
4. 待液体冷却至室温后，瞬时离心收集液体；然后加入 **20 μL** 充分涡旋混匀的**磁珠**悬浮液，再次吹打或涡旋混匀，室温静置 **5 min**，期间手动或涡旋混匀 1-2 次。
5. 将离心管置于磁力架上静置 **1-2 min**，确保所有磁珠被吸附溶液澄清，吸弃上清，保留磁珠。
6. 加入 **600 μL** **溶液 II** (确保已经按要求加入规定体积的无水乙醇) ，涡旋混匀 **1 min**。
7. 将离心管置于磁力架上静置 **1-2 min**，确保所有磁珠被吸附溶液澄清，吸弃上清，保留磁珠。
8. **【可选】** 重复步骤 6-7，再次洗涤磁珠。
9. 保持离心管在磁力架上，室温晾干 **3-5 min** 去除乙醇残留。**【注意】** 不能使磁珠过分干燥，否则可能会显著降低 DNA 回收率。
10. 加入 **30-50 μL** 经 65°C 预热的**溶液 III**，充分吹打或涡旋混匀，静置 2 min。**【可选】** 将离心管 65°C 孵育 10 min，期间吹打或涡旋混匀数次，以获得最佳洗脱效率。
11. 将离心管置于磁力架上静置 1-2 min，确保所有磁珠被吸附，转移洗脱液到新的无核酶离心管中。回收产物可以直接用于下游应用或者 -20°C 保存备用。



【常见问题及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
产物回收效率较低或者未回收到目的片段	胶块溶解不完全	适当增加水浴时间或增加颠倒次数
	产物浓度较低	纯化前通过琼脂糖凝胶电泳确认产物浓度，增加上样量
	紫外灯下切胶时间长导致部分 DNA 降解	将切胶时间缩短至 1min
	结合不充分	加入溶液 I 和磁珠后，确保混匀，磁珠应处于悬浮状态
	操作过程中磁珠丢失	结合和洗涤过程中尽量减少磁珠的损耗。在洗脱时，确保磁珠悬浮在溶液 III 中
	洗脱时间太短	加入溶液 III 后充分悬浮磁珠，延长洗脱时间或 65°C 孵育
	洗脱液不合适	洗脱液的 pH 对洗脱效率有很大影响，若使用超纯水进行洗脱 PH 不得低于 7
	洗涤液使用后未盖紧，乙醇挥发	重新配制 80%乙醇漂洗
	加入异丙醇后产生雾状或沉淀	发生盐沉淀，可颠倒混合样品
	电泳缓冲液不新鲜失去缓冲能力，导致 pH 增大，降低 DNA 与磁珠的结合能力	使用 3M NaAc pH5.2（自备）调整结合溶液为透明黄色配置新鲜缓冲液
回收的 PCR 产物进行酶切或者连接效率低	乙醇有残留	吸弃上清时，将管底的液体吸净，若管壁存在液体挂壁，可短暂离心后将离心管放入磁力架上再次吸净液体
	最后一步吸取上清时吸入磁珠	确保所有磁珠吸附在管壁时吸取上清，若不小心吸入磁珠，可将上清放入管中重新吸取
	回收产物反复多次冻融，影响后续实验反应	回收后立即进行实验
	目的片段和骨架载体的摩尔比不合适	选择合适摩尔比
	没有足够的 PCR 产物在末端带有 A 附加碱基	保证 PCR 最后 72°C 的 5-10min 延伸时间
琼脂糖凝胶胶块不溶	凝胶体积过大	可用枪头捣碎或切成小块
	琼脂糖质量差	选用高质量琼脂糖
	胶块在空气中放置过久，使胶块干燥失水	切胶后立即回收
	电泳缓冲液浓度过高或者陈旧	配制新鲜缓冲液
回收 DNA 存在多个条带	PCR 产物直接回收，引物特异性差	改为琼脂糖凝胶电泳后切取目的片段进行回收

