

PCR 产物纯化回收试剂盒

目录号 DP102

使用说明书

网站：www.codonx.com

咨询电话：010-56315162

技术支持 QQ：3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/关于平衡液 BS 的使用
- 8/操作步骤
- 9/常见问题与解决方案

1/适用范围:

适用于PCR反应产物、酶切产物DNA片段、探针标记纯化回收, DNA样品浓缩等。

2/产品组成:

试剂盒组成	保存	(DP102-01) 50 次	(DP102-02) 100 次	(DP102-03) 200 次
平衡液 BS	室温	5 mL	10 mL	20 mL
结合液 BB	室温	30 mL	60 mL	100 mL
漂洗液 WB	室温	15 mL	25 mL	50 mL
		第一次使用前按说明加入指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	10 mL	15 mL	25 mL
吸附柱 EC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 CT (2 mL)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

- 1) 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能会形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。使用前应该恢复到室温。
- 2) 储存于低温 (4°C 或者 -20°C) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此运输和储存均在室温下 (15—25°C) 进行。
- 3) 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

4/产品介绍:

在高离序盐存在的情况下, DNA 片段选择性吸附于离心柱内的硅基质膜上, 再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤, 去蛋白液和漂洗液, 可将引物、核苷酸、蛋白、酶等杂质去除, 最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净 DNA 从硅基质膜上洗脱。

5/产品特点:

- 1) 离心吸附柱内硅基质膜全部采用世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。
- 2) 使用优质结合液, 不含传统结合液的碘化钠和高氯酸盐, 不抑制回收后酶切、连接克隆等下游反应。

3) 结合液加酚红调制为黄颜色，便于监测 pH 值变化从而达到最佳结合效果，大大提高回收效率。

4) 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。

6/注意事项:

1) 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机。

2) 结合液中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或者生理盐水冲洗。

3) 回收纯化的 DNA 片段一般在 100 bp 到 40 kb 之间，过长、过短片段的回收效率迅速降低。

4) 回收 DNA 的量和起始 DNA 的量，洗脱体积，DNA 片段大小有关。一般 1-15 μL ，100 bp-5 kb 的 DNA 片段，回收率可高达 95%。

5) 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱，DNA 片段应该保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。DNA 片段如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10 mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

7/关于平衡液 BS 的使用:

1) 介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液 BS 预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液 BS 是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 使沉淀完全消失。

2) 使用方法：取一个新的吸附柱 EC 装在收集管 CT 中，吸取 100 μL 的平衡液 BS 至柱子中。1,3000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管 CT 中废液，将吸附柱 EC 重新放回收集管 CT。此时平衡液 BS 预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

8/操作步骤:

提示：第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇混匀，加入后请及时打勾标记，以免多次加入！

1) 每 100 μL PCR 扩增后体系或者酶切后体系加入 500 μL 结合液 BB，充分混匀。（如果初始体系小于 100 μL ，请预先用双蒸水调整至 100 μL ）。

平衡液 BS 预处理吸附柱：使用平衡液 BS 预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液 BS 的使用”

2) 将上一步所得溶液加入吸附柱 EC 中（吸附柱 EC 放入收集管 CT 中），室温放置 1

分钟，12,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管 CT 中的废液。

3) 加入 600 μ L 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。

4) 加入 600 μ L 漂洗液 WB, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。

5) 将吸附柱 EC 放回空收集管 CT 中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

6) 取出吸附柱 EC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 50 μ L 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液预先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量 DNA, 可将得到的溶液重新加入吸附柱中, 离心 1 分钟。

备注: 洗脱体积越大, 洗脱效率越高。如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 25 μ L, 体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少产量。

9/常见问题与解决方案:

问题	评论及建议
核酸产量低或纯度低	<ul style="list-style-type: none">a. 试剂暴露时间长, 每次用完立刻拧紧盖子, 以免溶液挥发, pH 改变和污染。b. 漂洗液 WB 忘加无水乙醇, 根据瓶上标签说明加入指定乙醇。c. PCR 产物和结合液 BB 未充分混匀, 加入试剂需要充分混匀。d. 洗脱液的 pH 不在最佳范围, 建议用洗脱液 EB, 或用 Tris-HCl 将水 pH 调至 7.5-8.0。
回收浓度低	<ul style="list-style-type: none">a. PCR 体系中模板 DNA 含量低, 适当增加模板量, 洗脱液的体积减少, 但注意体积不应少于 25 μL。b. 回收片段小于 100 bp 或大于 10 kb 时, 回收率都会下降, 建议增加 PCR 产物量。
回收 PCR 产物酶切不完全或不能切开	<ul style="list-style-type: none">a. 确认步骤 5 是否做, 若步骤 5 已做, 建议室温放置几分钟使残留乙醇挥发。b. 一些硅基质膜成分洗下来, 抑制了酶切反应, 建议将洗脱回收的 DNA 溶液 12,000rpm 离心 30-60 秒, 小心取上清使用。