



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **PCR产物纯化回收试剂盒**
 - ◆ 目录号 **DR02**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

PCR 产物纯化回收试剂盒

目录号: **DR02**

目录编号	包装单位
DR0201	50次
DR0202	100次
DR0203	200次

❖ 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。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

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



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°C-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。

❖ **产品介绍:**

在高离子盐存在的情况下，DNA 片断选择性的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。

❖ **产品特点:**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口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。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 使用了优质结合液，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. 结合液调制成为了黄颜色，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。





❖ **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13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
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100bp到40kb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片断大小有关。一般1-15 μ g，100bp-5kb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 $^{\circ}$ C。DNA片段如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM 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。





❖ 关于平衡液的使用

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℃ 使沉淀完全消失。
2. **什么情况下使用:** 一般刚买来 2,3 个月的新硅胶柱子不需要使用平衡液。时间存放较长吸附效率降低的硅胶柱子，可使用平衡液进行预处理来提高硅胶柱子结合能力从而提高核酸产量。或者预期片段难回收，或者回收起始量低预期产量低的情况，也可使用平衡液来提高回收效率。
3. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μ l 的平衡缓冲液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 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，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入!

1. 每 100 μ l PCR 扩增后体系或者酶切后体系加入 500 μ l 结合液 BB，充分混匀。(如果初始体系小于 100 μ l，请事先用双蒸水调整至 100 μ l)。
2. 将上一步所得溶液加入吸附柱 EC 中 (吸附柱放入收集管中)，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
3. 加入 700 μ l 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。



-
- 
4. 加入 500 μ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
 5. 将吸附柱 EC 放回空收集管中，12,000rpm 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（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000rpm 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。

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 DNA 洗脱效率，减少产量。

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
核酸产量低 或者纯度不高	<p>*试剂盒储存在非最佳条件-建议: 收到试剂盒后总是存放在室温(15℃-20℃)。</p> <p>*缓冲液或者试剂暴露于减少它们有效性的条件下-建议: 储存在室温(15℃-20℃), 每次用完后立刻盖紧盖子, 以免溶液蒸发, pH改变和污染。</p> <p>*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议: 第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</p> <p>*试剂和要回收溶液如 PCR 产物没有充分混匀-建议: 加入每个试剂后都要充分混匀。</p>
洗脱后 回收率低	<p>*使用了非最佳的洗脱液, 洗脱液的高 pH 非常重要-建议: 不要用水洗脱, 用试剂盒带的洗脱液 EB。</p>
回收后 DNA 下游酶切不能 切开或者 酶切不完全	<p>*忘记做步骤 5, 乙醇抑制了酶切反应-建议: 做步骤 5, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。</p> <p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应-建议: 将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用,</p>
纯化的 DNA 产物 OD ₂₆₀ 数值异常偏高	<p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 干扰了分光光度计读数-建议: 将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用。</p>



问题	评论与建议
洗脱液中不含 DNA	*在初始处理材料中没有 PCR 产物- 建议 : 开始回收前, 用琼脂糖凝胶/EB 电泳检测 PCR 产物。
回收后 DNA 的浓度太低	*起始的处理材料中 DNA 含量太低- 建议 : 加大处理量和减少洗脱液的体积, 但注意不要少于 30 μ l。 *回收的片段小于 100bp 或者大于 10kb - 建议 : 片段小于 100bp 或者大于 10kb 回收效率都会迅速降低, 可尝试提高起始处理量。
回收产量不高	*使用的结合液的量不足- 建议 : 确保 PCR 产物体积和结合液的比例是 1:5, PCR 覆盖的油、蜡、上样液的颜料并不影响回收过程。 *洗脱不完全- 建议 : 可使用 2 次洗脱缓冲液 EB 洗脱(每次 30 μ l), 合并两次洗脱液。

