

PCR产物纯化试剂盒 (目录号: RTP2202)

※ 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTP2202-02 (100次)	RTP2202-03 (200次)	贮存方式
结合液PB	100ml	2 × 100 ml	室温
3 M NaAc pH5.2	500 μl	500 μl	室温
漂洗液PW (浓缩液)	25ml	2 × 25ml	室温
洗脱缓冲液EB	15ml	15ml	室温
吸附柱CA2	100个	2 × 100个	室温
收集管 (2ml)	100个	2 × 100个	室温
说明书	1份	1份	

※ 储存条件:

本试剂盒在室温 (15–25°C) 干燥条件下, 可保存12个月; 更长时间的保存可置于2–8°C。(注意: 当低温贮存时, 使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在37°C水浴中预热10–20分钟, 以平衡溶液温度。)

※ 产品简介:

本试剂盒采用离心吸附柱结合独特的缓冲液系统, 从酶切、PCR等反应溶液中纯化DNA片段, 同时除去蛋白质、无机盐离子及寡核苷酸引物等杂质。使用本试剂盒可回收100bp–10kb的DNA片段, 回收率大于80% (<100bp和>10kb的DNA片段回收率为30–50%)。

每个吸附柱每次最多可吸附的DNA量约为10 μg。

使用本试剂盒回收的DNA适用于各种常规操作, 包括酶切、测序、文库筛选、连接和转化等实验。

※ 产品特点:

1 结合液PB为亮黄色, 便于观察体系的pH是否合适。

2 操作快捷, 单个样品操作少于10分钟。

※ 操作步骤:

如非指出, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1 在PCR反应液中直接加入5倍体积的PB液, 颠倒混匀后, 全部加入到吸附柱CA2中, 室温静置2分钟, 10,000g离心30–60秒, 到掉收集管中的废液, 将吸附柱CA2重新放入收集管中。

注: ● 如果PCR反应体系使用了石蜡油, 无需去除, 但要使用10倍体积的PB液。

● 如果PCR反应体系小于50 μl, 用水补至50 μl体系, 再加入PB液。

● 加入PB后, 如果体系体积大于800 μl, 请分次上柱, 保证全部溶液均加入到吸附柱中。

● 回收片段<500bp, 如要提高回收效率, 静置时间可延长到5分钟。

2 向吸附柱CA2中加入700 μl漂洗液PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 10,000g离心30–60秒, 倒掉废液, 将吸附柱重新放入收集管中。

3 向吸附柱CA2中加入500 μl漂洗液PW, 10,000g离心30–60秒, 倒掉废液。

4 将离心吸附柱CA2放回收集管中, 10,000g离心2分钟, 尽量除去漂洗液。

注: **此步必不可少! 如果漂洗液有残留, 将会影响回收效率和DNA质量, 进而影响下游实验; 离心后将吸附柱盖子打开, 室温放置2分钟, 这样将有助于彻底挥发残余乙醇。**

5 将吸附柱放到一个干净离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加30–100 μl洗脱缓冲液EB, 室温放置2分钟, 10,000g离心2分钟收集DNA溶液。

注: ● 可将洗脱缓冲液EB预热到60–70°C后再加到吸附膜上, 这样可以提高洗脱效率。

● CA2柱的洗脱体积不应少于30 μl, 体积小将会降低回收效率。

● 洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0–8.5范围内, pH值低于7.0会降低洗脱效率。

6 DNA产物–20°C保存。

产物纯化常见问题分析:

常见问题	可能原因	建议
片段未回收或回收率低	漂洗液PW中未加入无水乙醇或加入的比例不正确	首次使用前请严格按照标签说明加入无水乙醇; 用完后盖紧瓶盖, 以防乙醇挥发。
	体系pH太高	如果体系变为粉红色, 说明体系pH太高, DNA不能与吸附柱有效结合, 用少量NaAc pH5.2将溶液颜色调至黄色
	洗脱缓冲液pH不合适	吸附柱上的DNA在低盐和高pH条件下被有效洗脱。其最大洗脱效率pH在7.0-8.5之间。如用灭菌水洗脱, 保证pH在其范围内。
	洗脱体积太小	洗脱体积不能低于30 μ l, 并保证洗脱液加到吸附柱中间位置。
回收后的片段无法正常进行后续实验如连接后的转化效率低	引物二聚体的污染	该试剂盒可以去除绝大部分引物和引物二聚体, 但不能100%去除。该试剂盒纯化好的PCR片段可以适合大多数下游的分子生物学实验, 如果下游实验需要100%去除引物和引物二聚体, 只能电泳分离PCR片段, 再使用凝胶回收试剂盒(目录号: RTP2201)回收目的片段。
	回收产物中含有乙醇	漂洗液PW漂洗后, 离心2分钟必不可少; 离心后开盖室温放置2分钟有助于残余乙醇挥发。
	回收片段电泳有时出现双带或多带现象	小片段PCR产物更易出现如此情况。这种现象出现的原因不详, 可能与片段GC含量和序列有关。如果出现这种现象, 以下方案可以参考: 将洗脱产物95 $^{\circ}$ C加热2分钟, 移至室温自然冷却, 即可恢复单带构型。另外一种方法: 回收的此种片段-20 $^{\circ}$ C贮存一周左右, 大部分即可自然复性。