

PCR 清洁试剂盒

制品说明:

本试剂盒是从 PCR 反应液或其它各种酶促反应液中纯化 DNA 片段的试剂盒, 适用于从 PCR 反应液或其它各种酶促反应液中除去酶蛋白、DNA 引物 (小于 65mers 的引物都可以除去)、dNTP 等。

试剂盒采用了 DNA 制备膜技术, 具有高效、快速、方便之特点, 全套操作只需 15 分钟便可完成。

使用本试剂盒每次可纯化多至 20 μ g 的 DNA 片段 (50bp-20Kbp), 回收率高达 70-95%。回收得到的 DNA 纯度高 (不含酶蛋白、DNA 引物、dNTP 等), 可直接用于各种分子生物学实验。

Cat. No.	EK02104	EK02105	EK02125
制备次数	4 tests	50tests	250tests
DNA mini column	4	50	250
1.5ml collection tube	4	50	250
2ml collection tube	4	50	250
PCR binding buffer	2ml	20ml	100ml
Wash buffer B	2.4ml	24ml	72ml x2
Eluent solution	1ml	5ml	25ml

保存与运输:

- 1、本试剂盒可在室温下 (15-25 $^{\circ}$ C) 保存。
- 2、本试剂盒于室温下 (15-25 $^{\circ}$ C) 运输。

使用前的准备事项:

- 1、首次使用前, 向 Wash buffer B 中添加试剂瓶标签上指定体积的无水乙醇。
- 2、试剂中含有变性剂, 操作时应佩戴手套等防护用具。

操作方法:

- 1、向 PCR 反应液或其它酶促反应液中加入 3 倍量的 PCR Binding buffer, 如果需加入的 PCR Binding buffer 不足 100 μ l 时应加入 100 μ l, 然后均匀混合。(混匀后, 如在 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟, 回收效果更佳。)
- 2、将试剂盒中 DNA mini column 安置于 2ml collection tube (试剂盒内提供) 上。
- 3、将上述步骤 1 中的溶液转移至 DNA mini column 中, 室温 12000rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
注: 如将滤液再加入 DNA mini column 重复离心一次, 可以提高 DNA 的回收率。
- 4、将 500 μ l 的 Wash buffer B 加入到 DNA mini column 中, 室温 12000rpm 离心 30 秒, 弃滤液。
注: 使用前请确认 Wash buffer B 中已经加入了试剂瓶标签上指定体积的无水乙醇。
- 5、重复步骤 4。
- 6、将 DNA mini column 放回 2ml collection tube 上, 室温 12000rpm 离心 1 分钟。
- 7、将 DNA mini column 安置于新的 1.5ml collection tube (试剂盒内提供) 上, 在 column 膜的中央处加入 30 μ l 的去离子水或 Eluent solution, 室温静置 1 分钟。
注: 将去离子水或 Eluent solution 加热至 65 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。
- 8、室温 12000rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA。

附录: 负压法

- 1、正确连接负压装置, 将 DNA mini column 插到负压装置插口上, 向 PCR 反应液或其它酶促反应液中加入 3 倍量的 PCR Binding buffer, 如果需加入的 PCR Binding buffer 不足 100 μ l 时应加入 100 μ l, 混合均匀后转移至 DNA mini column 中, 开启负压装置, 调节负压至 -25-30 英寸汞柱, 缓慢吸走管中液体。
- 2、加 500 μ l 的 Wash buffer B 加入到 DNA mini column 中, 使用负压装置吸尽管中液体, 以同样的方法用 500 μ l 的 Wash buffer B 再洗一次。
注: 使用前请确认 Wash buffer B 中已经加入了试剂瓶标签上指定体积的无水乙醇。
- 3、将 DNA mini column 放于 2ml collection tube (试剂盒内提供) 中, 12000rpm 离心 1min。

- 4、将 DNA mini column 置于新的 1.5ml collection tube (试剂盒内提供) 中, 在 column 膜的中央处加入 30 μ l 的去离子水或 Eluent solution, 室温静置 1 分钟。
注: 将去离子水或 Eluent solution 加热至 65 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。
- 5、12000rpm 离心 1min 洗脱 DNA

注意事项:

- 1、纯化的 DNA 用于 DNA 序列分析时, 最好使用灭菌水洗脱 DNA。
- 2、DNA 需长期保存时, 建议在 Eluent solution 中保存。

FAQ:

Q1: 纯化 DNA 时, 一般使用多少洗脱液洗脱?

A1: 可以根据所需浓度计算使用洗脱液的体积, 一般情况下, 洗脱液体积大于 30 μ l 即可洗脱制备柱中 90% 以上的 DNA, 所以洗脱体积最好大于 30 μ l, 当对 DNA 浓度要求较高时, 也可以减少洗脱液体积至 20 μ l, 但回收率会略有下降, 应注意使用预热的洗脱液洗脱, 并在洗脱离心之前静置 1 分钟以上, 以增加洗脱效率。

Q2: 本试剂盒一次可以回收的 DNA 量的范围是多少?

A2: 本试剂盒中制备柱一次回收的最大吸附量可达 20 μ g 以上, 最小 DNA 起始量也可低至 500ng, 所以使用前请对 DNA 样品的总量进行检测。

Q3: DNA 的收量较低, 为什么?

A3: 一般情况下, DNA 的回收率可以达到 70-95%。DNA 收量较低时, 可以从以下几个方面考虑:

- 1) 使用确认 Wash buffer B 中是否加入指定体积的无水乙醇。
- 2) 洗脱前的空离步骤 6 不可省略, 此步骤可以除去制备柱上残留的洗液中的乙醇, 否则影响洗脱效率。
- 3) 洗脱时将灭菌蒸馏水或 Eluent solution 加热到 60 $^{\circ}$ C 后使用有利于提高洗脱效率。

Q4: 纯化得到的 DNA 反应性能不佳 (酶切、连接), 为什么?

- A4: 1) 洗脱液中残留部分盐离子, 加入 Wash buffer B 后室温静置 5 分钟, 有助于彻底清洗掉制备柱上残留的盐离子。
- 2) 洗脱液中残留乙醇, 在向制备柱中加入洗脱液之前, 将制备柱在室温下静置 2 分钟有助于使制备柱上残留的乙醇彻底挥发, 然后再加入洗脱液洗脱。
- 3) 进行 DNA 洗脱时用去离子水或 Eluent solution 洗脱。