

FastPure PCR Purification Kit Handbook

PCR 产物纯化试剂盒说明书 (离心柱型)

产品组成

FastPure PCR Purification Kit		
产品编号	EK-1102-50T	EK-1102-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer PB	30ml	60ml
Buffer PW	12ml	24ml
Buffer EB	10ml	20ml
PCR Spin Columns	50 个	100 个
2ml Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒采用可高效、专一结合 DNA 的硅基质材料和独特的缓冲液系统，适用于从 PCR 产物、限制性内切酶体系、或其他酶促反应液中回收 100bp-10kb 的 DNA 片段，回收率可达 90% 以上，每个吸附柱每次可吸附的 DNA 量为 20 μ g。使用本试剂盒回收的 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、文库筛选、连接和转化等实验。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

存储条件

该试剂盒置于室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 干燥条件下，可保存 12 个月，更长时间的保存可置于 2-8 $^{\circ}$ C。2-8 $^{\circ}$ C 保存条件下，Buffer PB 可能产生沉淀，使用前可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中预热 10 min 至沉淀溶解。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无菌 1.5ml 离心管

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 本试剂盒为无选择性的回收溶液内所有 DNA 片段，如需回收特定片段，同时去除其他不同大小的片段，请选择琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒。
- 回收 <100bp 或 >10kb 的 DNA 片段时，应加大 Buffer PB 的体积，延长吸附和洗脱时间。
- 回收率与初始 DNA 量和洗脱体积有关，初始量越少、洗脱体积越少，回收率越低。
- 高温及潮湿等不利环境因素对吸附柱产生影响，请将吸附柱储存于阴凉干燥的环境中。

开始前试剂准备

- 按瓶子标签所示，加入 4 倍体积的无水乙醇稀释 Buffer PW，于室温密封保存。
- 确认 Buffer PB 溶液显示为黄色。

DNA 浓度及纯度检测：

- 回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。
- DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA、40 μ g/ml 单链 DNA。
- OD260/OD280 比值应为 1.7-2.0，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用 ddH₂O 比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

操作步骤:**1. 将 5 倍体积的 Buffer PB 添加到 1 倍体积的 PCR 样品中, 然后混匀。**

例如, 将 500 μ l Buffer PB 添加到 100 μ l PCR 样品 (不包括油的体积), 无需去除石蜡油或矿物油。

2. 溶液完全溶解后, 检查颜色是否为黄色。

如果混合物的颜色为红色, 则加入 10 μ l 3 M 醋酸钠(pH 5.0)并混合, 混合物的颜色会变成黄色, DNA 吸附到膜上仅在 pH \leq 7.5 时有效。Buffer PB 含有一种 pH 指示剂, 在 pH \leq 7.5 时为黄色, 在较高 pH 时为红色, 可通过颜色轻松确定 DNA 结合的最佳 pH。

3. 将吸附柱套在 2ml 收集管中, 并将上一步得到的溶液加入到吸附柱中, \geq 8000 \times g (\geq 10,000 rpm)离心 30s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

吸附柱最大容量为 700 μ l, 若样品体积大于 700 μ l, 可分批加入。

4. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer PW (已加入无水乙醇), \geq 8000 \times g (\geq 10,000 rpm)离心 30s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

注意: 如果回收的 DNA 是用于盐敏感的实验, 例如平末端连接实验或直接测序, 建议加入 Buffer PW 后静置 2-5min 后再离心。

5. 重复操作步骤 4 一次。**6. 倒掉收集管中的废液后将吸附柱再次套入收集管中, 最大转速 (\sim 13,400 \times g)离心 2min 以干燥吸附柱膜, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。将吸附柱套入新的 1.5ml 离心管中并于室温开盖放置 5-10min 彻底晾干。**

注意: Buffer PW 中的乙醇残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。

7. 向吸附柱膜中央位置悬空滴加 30-50 μ l Buffer EB, 盖上盖子室温静置 2min 后, 最大转速 (\sim 13,400 \times g)离心 2min 收集 DNA 溶液并置于-20 $^{\circ}$ C保存。

注意: 洗脱体积不应小于 30 μ l, 体积过少影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响, 若后续做测序, 需使用 ddH₂O 做洗脱液, 并保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。为了提高 DNA 的回收量, 可重复操作步骤 7 一次。

常见问题:**1. 回收效率低**

- **Buffer PB 加入量不够:** 正确测量 PCR 反应液体积, 加入足量 Buffer PB。
 - **洗脱液体积太小:** 建议用 Buffer EB 洗脱两次, 以获得最高的回收率。洗脱液必须加入柱子的膜中央。洗脱效率取决于洗脱体积和次数。
 - **试剂准备有误:** Buffer PW 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- 2. 下游应用不理想**
- **盐污染:** 在加入 Buffer PW 的步骤中, 将 Buffer PW 加入吸附柱盖上盖子后静置 5min 再离心。
 - **纯化的 DNA 还含有引物二聚体:** 当 PCR 产物中引物二聚体污染严重时, 加入适当的 0.5M NaOH 有利于减少引物二聚体的污染。
 - **乙醇污染:** 洗脱 DNA 前, 打开柱子的盖子, 空气干燥 10~15min 以彻底去除乙醇。