

# PCR 产物及 DNA 片段纯化试剂盒

## 产品组分

组分	N1091	N1092	N1093
溶液 BD	20 ml	40 ml	80 ml
溶液 PE	15 ml	15 ml×2	20 ml×3
溶液 Eluent	2.5 ml	5 ml	10 ml
DNA 纯化柱	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

- 溶液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1:4 稀释, 即含 80%乙醇。
- 溶液 BD 中含有变性剂, 请不要直接接触皮肤。
- 上述产品组分均可单独购买, 详见产品索引。

## 产品说明

本产品采用传统的硅胶柱膜吸附技术, 用于从 PCR 或其他各种酶促反应液中纯化 DNA 片段 (50 bp-40 kb)。其纯化原理是硅胶膜柱高效可逆地吸附体系中的 DNA 片段 (高盐、低 pH 值), 同时去除酶蛋白、核酸引物、dNTP 等其他杂质, 被吸附的 DNA 再在低盐、高 pH 值条件下再被洗脱纯化。一次可回收 30 $\mu$ g 高纯度 DNA 片段, 此 DNA 片段可直接用于各种酶促反应等。

## 质量控制

从 PCR 扩增产物中纯化 50 bp 和 1,000 bp 的 DNA 片段。

## 保存条件

室温保存 2 年。

## 注意事项

- 溶液 PE 第一次使用前请按瓶上标签加入 4 倍体积的无水乙醇, 即 15 ml 溶液 PE 中加入 60 ml 无水乙醇, 20 ml 溶液 PE 中加入 80 ml 无水乙醇, 使用后立即盖紧盖子。
- 本试剂盒适用于无选择性的回收体系中所有的 DNA 片段。如需选择性回收特定片段, 同时去除其他不同大小片段, 建议选择凝胶回收试剂盒。
- 本试剂盒纯化柱的 DNA 吸附能力强。但如果 DNA 浓度小, 或 DNA 初始量少, 回收率将会偏低。
- 溶液 Eluent (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) 中不含 EDTA, 其收集的 DNA 片段可直接用于各种酶促反应等, 不会影响后续试验。
- 为了保证回收效率, 请不要使用未调整 pH 值的超纯水洗脱目的片段。
- 请严格按照操作步骤操作。

## 操作步骤

- 1 确定 PCR 反应液或其他酶促反应液的体积。将 PCR 反应液或其他酶促反应液转移至一个新的 1.5 ml 离心管中, 向其中加入等体积溶液 BD, 混合均匀。
- 2 将步骤 1 所获溶液置于 DNA 纯化柱中, 静置 2min。
- 3 12,000 rpm 离心 1min, 弃滤液。
  - 此时 DNA 片段被吸附于 DNA 纯化柱中的硅胶膜上。
  - 若溶液体积大于纯化柱容积 (800 $\mu$ l), 可分两次离心。
- 4 加入 500  $\mu$ l 溶液 PE。12,000 rpm, 离心 1min, 弃滤液。
  - 溶液 PE 初次使用前用无水乙醇按 1:4 稀释, 即含 80%乙醇。
  - 此步骤的作用是将硅胶膜上吸附的蛋白、盐等杂质洗脱, 以获得高质量 DNA 片段。
- 5 加入 500  $\mu$ l 溶液 PE。12,000 rpm, 离心 1min, 弃滤液。
- 6 12,000 rpm 离心 3min, 以彻底去除纯化柱中的液体。
  - 此步骤的作用是去除残留乙醇, 避免残留乙醇影响后续酶促反应。同时也利于 DNA 片段的充分溶解。
- 7 将离心柱置于新的 1.5 ml 离心管中。向纯化柱的中央处, 悬空滴加 30-100  $\mu$ l 溶液 Eluent (60 $^{\circ}$ C 预热), 静置 2min。12,000 rpm 离心 1min, 管底即为目的 DNA 片段。贮存于 -20 $^{\circ}$ C。
  - 溶液 Eluent 可用无菌双蒸水代替, 但其 pH 需为 8.0-8.5, 加入体积视 DNA 目的片段的多少、用户对目的片段浓度要求而定。
  - 对溶液 Eluent 60 $^{\circ}$ C 预热, 会提高提取 DNA 目的片段的产量。

**Q&A****问：常用的 DNA 浓度及纯度检测方法有哪些？**

答：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。

琼脂糖凝胶电泳通过对比定量的 Marker 来定量浓度；

紫外分光检测 OD<sub>260</sub>/280 比值, OD<sub>260</sub>/280 比值在 1.7-1.9 之间说明所得 DNA 纯度较好, 如果洗脱时不使用溶液 Eluent 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值, 但不表示纯度低。

**问：长片段回收时应注意哪些问题？**

答：当 DNA 片段长度较长（5 kb 以上）时，回收效率会有所下降，这是 DNA 切胶回收时的常见现象。此时建议按以下方法解决问题：

- 1 适当增加待回收 DNA 样品的点样量；
- 2 由于长片段 DNA 不易从树脂上洗脱下来，建议洗脱两次，可以提高洗脱效率；
- 3 减少操作过程中对长片段 DNA 的物理损伤，如混合振荡操作不要过于剧烈，切胶时不要将 DNA 长时间暴露在紫外等下。