

PCR 产物回收试剂盒

50 T

Cat #:GV-PCR-P-50

本试剂盒可从溶液中直接回收 DNA 片段，不含盐、蛋白质、RNA 等杂质。500bp 以上片段，回收率 90%以上，200bp~500bp 回收率 70%以上，80bp~200bp 回收率 60%。可回收单链、双链 DNA 片段以及环状质粒 DNA。

本试剂盒采用一种独特的平衡液处理吸附膜，该试剂能够激活硅基质膜，改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性，专一吸附 DNA 的作用，同时还可消除高温/潮湿或其他不良环境因素对吸附柱造成的影响。

一、试剂盒组成、储存、稳定性

| 成分 | 规格 | 注意事项 |
|---------------|-------|--------------------|
| Buffer PCR-GA | 60 ml | |
| Buffer PCR-BL | 12ml | |
| Wash buffer | 13 ml | 使用前加入 52ml 无水乙醇 |
| Elution | 4 ml | |
| 离心柱 | 50 个 | 单个最大吸附量 20 μ g |
| 1.5ml 离心管 | 50 个 | |
| 说明书 | 1 份 | |

Buffer PCR-GA: DNA 结合液。室温密闭贮存。

Buffer PCR-BL: 平衡液，平衡液的加入能够激活硅基质膜，改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性，专一吸附 DNA 的作用，同时还可消除高温/潮湿或其他不良环境因素对吸附柱造成的影响。

Wash buffer: 去盐液。使用前，根据瓶上指定的体积加入无水乙醇，混合均匀，室温密闭贮存。

Elution: 10mM Tris-HCl, pH8.0。室温密闭贮存。

二、注意事项

- 1: DNA 呈酸性，建议在 10mM Tris-HCl, pH8.0 洗脱液中保存
- 2: 用平衡液处理过的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果
- 3: Buffer PCR-BL 含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询

三、实验前试剂准备

- 1: 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管
- 2: 第一次使用前，Wash buffer 中加入 52ml 无水乙醇。
- 3: 使用前，检查 Buffer PCR-GA 是否出现沉淀，若出现沉淀，应于 65 $^{\circ}$ C 温浴溶解并冷却至室温后再使用。
- 4: 将 Elution 或双蒸水加热至 65 $^{\circ}$ C，有利于提高洗脱效率

四、操作步骤:

- 1: 在 PCR 产物中加入 3 倍体积的 Buffer PCR-GA，PCR 产物不足 50 μ l 的用 TE buffer 补足到 50 μ l，混匀溶液。

注: DNA 片段小于 200 bp 时，可将 Buffer PCR-GA 按 1:5 加。

- 2: 溶液上柱前离心柱处理: 在离心柱中加入 200 μ l Buffer PCR-BL, 12000rpm 离心 1min, 去掉收集管中的平衡液。
- 3: 将步骤 1 中溶液置于离心柱中, 静置 2 min, 12,000 rpm 离心 30 s, 若一次加不完, 可分两次离心, 倒掉液体。
- 4: 加入 500 μ l Wash buffer (**Wash buffer 第一次使用前加入 52 ml 无水乙醇!**) 于离心柱中, 静置 2min, 12,000rpm 离心 30s, 弃液体。
- 5: 重复步骤 4 一次。
- 6: 12,000 rpm 再次离心 1 min, 甩干剩余液体以除去残余酒精。
- 7: 将离心柱置于新的离心管中, 室温敞开心管盖放置 5~10 min, 使乙醇挥发殆尽。
- 8: 加入 20~60 μ l Elution (Elution 用前 65 $^{\circ}$ C 预热), 静置 2 min。
- 9: 12,000 rpm 离心 2 min, 管底溶液即为所需 DNA。将 DNA 贮存于-20 $^{\circ}$ C

五、纯化效果检测

回收后得到的产物可用琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计检测浓度和纯度。

DNA 在 260nm 处有吸收峰, 检测时应该使 OD₂₆₀ 值在 0.1 到 1.0 之间数值较准确。OD₂₆₀ 为 1 时大概相当于 50 μ g/ml 双链 DNA, 40 μ g/ml 单链 DNA。

核酸浓度 (μ g/ml) = OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数。 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值应该为 1.7~2.0。

六、常见问题分析:

| 常见问题 | 可能原因 | 建议 |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 回收率低 或没有条带 | Wash buffer 中没有加入无水乙醇 洗脱液使用不当 洗脱不充分 电泳缓冲液 pH 过高 样品过少, 浓度过低 | 确保 Wash buffer 中加入无水乙醇 确保使用试剂盒提供的溶液 Elution 确保足够洗脱时间和 Elution 用前 65 $^{\circ}$ C 预热 确保待测样品电泳时使用新鲜缓冲液 加大样品用量 |
| 回收产物 无法进行 后续实验 | 乙醇残留 盐残留 | 室温低时, 可适当延长晾干时间, 或放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中晾干 确保洗涤液用量和洗涤两次, 每次离心将液体离尽。 |