

AFT PCR & DNA Fragment Purification Kit

PCR 片段纯化试剂盒

产品名称	单位	货号
AFT PCR & DNA Fragment Purification Kit	50T	AFT2014-01

【储存条件】

常温运输，室温（15~30℃）保存，保质期一年。如需长期保存，可将各试剂组分置于 2~8℃，使用时如发现结晶，可于 37~55℃ 水浴加热助溶。离心吸附柱不建议低温或大于 30℃ 保存，否则可能影响吸附效率。

【产品简介】

AFT 快速 DNA 胶回收试剂盒利用硅基质材料在高盐缓冲系统对 DNA 高效、专一吸附的原理，配备 AFT 自主研发的膜结合液（又称溶胶液）和高性能的硅胶膜离心吸附柱，用于纯化 PCR 反应产物或其他酶促反应体系中的蛋白质、残留 dNTP、引物、盐分等其他杂质，对引物二聚体的清除率在 70% 以上。本试剂盒配套的膜结合液和离心吸附柱的最大吸附量为 20 μg，对 100 bp~10 kb 线性 DNA 片段的回收效率可高达 95%，也可应用于 20 kb 以下环形质粒的脱盐纯化。整个操作可在 10 分钟内完成，快速、简便。回收后的 DNA 可以直接用于酶切、连接、测序、标记、杂交和体外转录等多种分子生物学实验。

【回收效率】

线性 DNA 片段大小	回收效率
50 bp	30~50%
100 bp ~ 200 bp	50~70%
200 bp ~ 5 kb	70~90%
5 kb ~ 10 kb	50~70%

【产品组份】

	50T	注意事项
膜结合液（MB）	25ml	初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀
膜漂洗液（MW）	15ml	
洗脱缓冲液（EB）	10ml	室温密闭干燥保存
离心吸附柱及收集管	50 套	

初次使用本试剂盒，请按瓶标说明向膜漂洗液（MW）中加入相应体积的无水乙醇（用户自备），并在试剂瓶上做标记。

【实验准备】

用户需自行准备的材料：无水乙醇，异丙醇，台式离心机。

【操作步骤】

1. **DNA 结合:** 按每 1 μ l DNA 样品加入 1 μ l 膜结合液 (MB) 的比例 (1:1) 加入膜结合液, 混匀后转移到插入收集管的离心吸附柱内, 室温静置 1 分钟, 室温下 $\geq 12,000 \times g$ 离心 1 分钟, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新插回收集管中。

离心吸附柱的最大吸附量为 20 μ g, 每次最多可离心 950 μ l 溶液, 如溶液体积大于 950 μ l, 可分批转移到同一吸附柱内, 分次离心; 若样品体积低于 50 μ l, 可用灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液 (EB) 补足至 50 μ l, 再加入 50 μ l 的膜结合液 (MB)。为增加小片段的回收效率, 当回收的 DNA 片段小于 300 bp 时, 或大于 3000bp 时, 可加入 1:1 体积的异丙醇。

2. **清洗:** 加入 700 μ l 膜漂洗液 (MW, 请确认已加入无水乙醇) 于离心吸附柱中, 室温下 $\geq 12,000 \times g$ 离心 30 秒, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新插回收集管中。

3. **再次清洗:** 加入 500 μ l 膜漂洗液 (MW) 于离心吸附柱中, 重复离心一次。弃除废液后, 将离心吸附柱去盖再次离心 1 分钟, 彻底去除残余漂洗液。

4. **洗脱:** 小心取出离心吸附柱, 将其套入一个新的 1.5 ml 灭菌离心管中。向硅胶吸附膜的中央加入 30 μ l 洗脱缓冲液 (EB), 室温静置 1 分钟后, $\geq 12,000 \times g$ 离心 1 分钟收集纯化的 DNA 片段。

为提高回收片段浓度, 离心收集后可将洗脱后的溶液再次加入离心吸附柱中重复洗脱一次, 可提高约 20% 的产量; 如必须使用无菌去离子水洗脱, 需注意其 pH 值是否接近中性, 否则应使用 NaOH 溶液将 pH 值调节至 7.0~8.5 之间。

5. **储存:** 弃除离心吸附柱, 获得的 DNA 片段可直接用于后续反应或于 -20°C 长期保存。

【常见问题及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
回收效率低	膜结合液 (MB) 使用量不当	按 1 μ l DNA 溶液加入 1 μ l 膜结合液的比例 (1:1) 加入膜结合液
	离心力不足, DNA 未与硅胶膜充分结合	$\geq 12,000$ rpm 离心, 如果离心机达不到该转速, 可适当延长离心时间以确保胶溶液完全通过硅胶膜
	膜漂洗液 (MW) 未添加乙醇	第一次使用时按比例添加乙醇, 并在试剂瓶上做标记
	洗脱溶液 pH 值不合适	使用试剂盒提供的洗脱缓冲液 (EB); 如用去离子水洗脱, 需将 pH 值调至 7.0~8.5 范围
	洗脱溶液体积小	使用 30 μ l 以上洗脱溶液, 加至硅胶膜的中央, 静置 1 分钟, 使膜完全浸润后再离心
回收产物测序结果不佳	用量太低	提高测序反应使用的 DNA 量; 如果回收产物浓度过低, 可通过乙醇沉淀浓缩产物
	用量过高, 干扰测序结果	降低 DNA 用量, 必要时用 EB 或灭菌双蒸水进行稀释
	TE 缓冲液干扰测序结果	使用无 DNA 酶污染的洗脱缓冲液 (EB) 或灭菌双蒸水溶解 DNA 作为测序模板
酶切效果不佳	酶的质量低劣或使用方法不当	按照厂家说明书正确使用酶; 设立阳性对照检测内切酶活性
	膜漂洗液 (MW) 去除不彻底, 胶回收产物中残留有乙醇或盐	再次乙醇沉淀回收, 并确保 DNA 溶液体积不高于酶切反应总体积的 10%
电泳上样时漂出上样孔	未添加上样缓冲液	与适量上样缓冲液混合后上样
	膜漂洗液 (MW) 去除不彻底, 胶回收产物中残留有乙醇	确保洗涤步骤中洗涤缓冲液去除彻底, 可增加离心时间或开盖放置一段时间使残留乙醇挥发
回收产物电泳条带不锐利	DNA 分子断裂	混合等操作尽量小心, 特别是大片段, 应避免 DNA 因机械损伤而断裂
	其他 DNA 分子污染	控制 PCR 反应条件, 防止非特异性扩增
	DNA 分子降解	PCR 产物不能及时回收, 应于 4°C 保存, 避免 DNA 降解
克隆效率低	离心吸附柱漂洗不彻底	再次乙醇沉淀回收
	回收过程中有外切酶污染, 导致 DNA 片段末端序列缺失	回收过程保证无菌操作
	感受态细胞的效率差	确保感受态制备和保存方法正确

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。