

测序产物纯化（乙醇/EDTA 沉淀法）

整个流程需要大约 90 分钟。

注意：这种纯化方法能得到纯净的产物，但可能导致小片段的丢失。

重要提示：无水乙醇会从空气中吸取水分，这会导致其浓度降低并影响测序结果。因此要注意无水乙醇的保存，并经常更换。

1. 用 0.5 M, pH 8.0 的 EDTA 制备 125 mM 的 EDTA 溶液。
2. 用无水乙醇配置 70% 的乙醇。

注意：此试剂要每 2 周更换。

重要提示：不要预先把 125 mM 的 EDTA 溶液和无水乙醇混在一起，这会导致 EDTA 的沉淀。

3. 使用带吊篮的离心机短暂离心测序反应板（1000 g, 5-10 秒）。
4. 去除封板膜。
5. 按顺序添加下列成分：

| 成分 | 体积 | |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 测序反应体系（起始体积） | 10 μ L | 20 μ L |
| 125 mM EDTA 溶液 | 2.5 μ L | 5 μ L |
| 无水乙醇 | 30 μ L | 60 μ L |
| 总体积 | 每孔 42.5 μL | 每孔 85 μL |

重要提示：直接将 EDTA 加入每孔的样本中。如果在管壁上能看到 EDTA 的液滴，则将反应板短暂离心以确保其与测序反应体系完全混合。

6. 使用 MicroAmp™ Clear Adhesive Film（货号：4306311）密封反应板。
7. 振荡反应板 2-3 秒，然后在 1000 g 离心 5-10 秒。
8. 将反应板在室温孵育 15 分钟；

重要提示：这一步骤的时间非常重要。

9. 使用带吊篮的离心机离心反应板，1870 g（4°C）离心 45 分钟。

重要提示：此步骤结束后要立即进行下一步骤。如果中间有延迟，则需要在开始下一步骤前将反应板再离心 2 分钟。

10. 缓慢去除封板膜以避免破坏沉淀。在离心机中放置 4 层吸水纸，然后小心地将反应板倒

扣在纸上，注意不要让沉淀移位。185 g 离心 1 分钟。

不要先吸出液体。不要拍打反应板来帮助液体流出。

11. 向每孔加入 70%的乙醇。

| 起始反应体积 | 70%酒精的体积 |
|------------|------------|
| 10 μ L | 30 μ L |
| 20 μ L | 60 μ L |

12. 使用 MicroAmp™ Clear Adhesive Film 密封反应板，然后在 1870 g (4°C) 离心 15 分钟。

重要提示：此步骤结束后要立即进行下一步骤。如果中间有延迟，则需要开始下一步骤前将反应板再离心 2 分钟。

13. 缓慢去除封板膜以避免破坏沉淀。在离心机中放置 4 层吸水纸，然后小心地将反应板倒扣在纸上，注意不要让沉淀移位。185 g 离心 1 分钟。

不要先吸出液体。不要拍打反应板来帮助液体流出。

14. 在室温下，将反应板正面朝上且避光放置 5-10 分钟，自然晾干。

注意：如果纯化产物需要保存，可以用 MicroAmp™ Clear Adhesive Film 密封反应板避光保存。如果是在准备上机测序前短暂保存，可以放在 4°C；如果要保存较长时间，则需要放置在-20°C。

出版编号 MAN0019938 修订版 A



Applied Biosystems
技术支持服务中心
800-820-8982
400-820-8982

© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C