

寡核苷酸退火缓冲液（Annealing Buffer,10×）使用说明书

【包装规格】

产品编号	产品名称	包装
ED-8467	Annealing Buffer for Oligonucleotides (10×)	1mL/1mL×5 管
	使用说明书	1 份

【保存条件】

-20 °C保存，有效期 12 个月

【概述】

本产品专为单链寡核苷酸（Oligo）的杂交退火设计，适用于-5-500 bp 的 DNA 片段。

- **核心优势：**特别优化了针对 **RNAi (shRNA)**和 **CRISPR (gRNA)** 载体构建中复杂序列的退火效果。由于此类序列常含有约 20 bp 的互补回文序列，极易形成内部发夹结构；本缓冲液能有效抑制自身折叠，诱导两条 Oligo 正确配对。
- **应用场景：**退火产物可直接用于经酶切、纯化的质粒连接反应，转化效率高，阳性克隆比例大。

【操作方法】

I. 体系配制（如下 20 μl 体系为例）

Reagent 试剂	Amount 试剂量
正链 Oligo(10μM)	5μl
负链 Oligo(10μM)	5μl
ddH ₂ O	8 μl
Annealing Buffer(10x)	2μl
	20μl

II. 退火条件

方式 A：PCR 仪程序（进阶方案，推荐）

		Cycles	Temperature	Time
Simple Protocol	Step 1:	1	95°C	5 min
简易步骤	Step 2:	70	95°C (-1°C/cycle)	1 min

	Step 3:	4°C	HOLD
<i>Advanced Protocol</i> 进阶操作步骤 (以 T_m 值 55°C 为例)	Step 1:	1	95°C
	Step 2:	40*	95°C (-1°C/cycle)
	Step 3:	1	55°C
	Step 4:	20	55°C* (-1°C/cycle)
	Step 5:		4°C

*步骤 2 和 4 中的循环数取决于要退火的寡核苷酸的 T_m 。

方式 B: 传统水浴/干浴法 (简易方案)

1. 将混合好的离心管置于 95°C 加热模块或水浴锅中。
2. 保持 95°C 孵育 5 min。
3. 关闭电源，将离心管留在模块/水浴中，使其随温自然冷却至室温（通常需 1-2 小时）。

注：冷却至室温前切勿中途取出或直接放入冰上，骤降温会导致大量错配或发夹形成。

【注意事项】

1. **Oligo 纯度:** 建议使用经过 PAGE 纯化更高方式纯化的 Oligo（更高纯度决定成功率），杂质可能会降低退火效率。
2. **浓度匹配:** 为获得最高比例的双链片段，正负链应严格按照 1:1 摩尔比混合。
3. **稀释建议:** 退火后的双链 Oligo 浓度较高（本体系为 2.5 μM ），在与质粒连接前，通常需要用 ddH₂O 或 1× Annealing Buffer 稀释 10-100 倍。
4. **安全防护:** 仅限科研使用。操作时请穿戴实验服、一次性手套和口罩。