

YALEPIC[®] 快速 PCR 产物/琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒

YALEPIC[®] Fast PCR And Gel DNA Purification Kit

产品货号

YC48001-200 (200T) ; (试) YC48001 (5T)

产品保存及运输条件

常温运输; 10 ~ 30°C 室温保存一年。

产品概述

YALEPIC[®] Fast PCR And Gel DNA Purification Kit 采用新型硅基质膜技术和试剂配方, 通过快速简单的结合-洗涤-洗脱三步, 15 min 内即可从琼脂糖凝胶 DNA 或 PCR 产物/酶反应液 (酶切, 连接, 探针标记等) 中纯化回收 100 bp ~ 20 kb 的 DNA 片段, 每个吸附柱最高可吸附 10 µg 的 DNA, 同时最大限度的去除引物、寡核苷酸、酶、矿物油、琼脂糖等杂质。纯化回收的 DNA 纯度及浓度高, 完整性好, 回收率高, 可直接用于测序、连接和转化、标记、体外转录等分子生物学实验。

产品组分

序号	产品组分	YC48001-200	(试) YC48001
①	YGP Buffer	100 ml	2.5 ml
②	YB Buffer	120 ml	3 ml
③	YS Buffer	45 ml	1.5 ml
④	PW Buffer	50 ml	6 ml
⑤	YEB Buffer	15 ml	400 µl
⑥	3 M 醋酸钠	6 ml	200 µl
⑦	Pure Columns GP with Collection tubes	200 T	5 T

适用范围

1. 适用于各种浓度的 TAE 或 TBE 琼脂糖凝胶;
2. PCR 产物、酶促反应体系或其它各种方法获得的 DNA 粗制品。
3. 回收片段范围为 100 bp ~ 20 kb。

自备试剂及仪器

无水乙醇；异丙醇；涡旋振荡仪；高速离心机；Nuclease-free 无菌移液器吸头；Nuclease-free 离心管；恒温水浴锅。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施，穿戴实验服、手套、口罩等。使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品，试剂使用完后立即盖好瓶盖，避免交叉污染的风险。
2. 首次使用前向 **PW Buffer** 中加入标签指定量的无水乙醇。试用装 (5T) 中 **PW Buffer** 已含无水乙醇，使用后请立即盖好瓶盖防止乙醇挥发。
3. 每次使用前检查 **YGP Buffer**、**YB Buffer** 是否出现结晶或沉淀，如有沉淀，可在 37°C 水浴 5 min，即可恢复澄清。
4. **YGP Buffer** 中含有 pH 指示剂，当 $\text{pH} \leq 7.5$ 时溶液的颜色为黄色，DNA 才能与膜结合，当 pH 值偏高时溶液的颜色变为桔红色和紫色，需调整至黄色。（注：请勿直接接触溶液，使用时应戴乳胶手套，使用后请立即盖紧盖子使用后确保拧紧瓶盖）
5. 电泳时建议使用新的电泳缓冲液，避免影响电泳和回收效果；如下一步实验要求较高，请尽量使用 TAE 电泳缓冲液。
6. 切胶时，紫外照射时间应尽量短，避免对 DNA 造成损伤。
7. 提前将水浴锅温度设至 50 ~ 56°C。
8. 回收率与初始 DNA 量和洗脱体积有关，初始量越少，洗脱体积越少，回收率越低。
9. 平衡后的 **Pure Columns GP** 需立即使用，避免放置时间过长影响使用效果。

实验流程

● 柱平衡

1. 向已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns GP with Collection tubes**) 中加入 200 μl **YS Buffer**，室温静置 1min，13,000 rpm 离心 2 min，弃去收集管中废液，将吸附柱重新放回管中。（注：需当天处理并使用吸附柱）

● 琼脂糖凝胶回收方案

1. DNA 电泳结束后，在紫外灯下快速切下单一目的 DNA 片段的凝胶，建议用纸巾吸尽凝胶表面液体并尽量去除多余的凝胶，若胶块的体积过大，可将胶块切碎便于快速溶解。
2. 称取凝胶重量（去除空管重量），100 mg 凝胶等同于 100 μl 体积，作为一个凝胶体积。
3. 向胶块中加入等倍体积的 **YGP Buffer**。
4. 50 ~ 56°C 孵育 7 ~ 10 min，其间每隔 2 ~ 3 min 温和地上下颠倒离心管，待溶胶液充分溶解，且凝胶液为黄色时可进行后续操作。

注：

- 1) 凝若胶溶液为桔红色或紫色，可向胶溶液中加入 10 ~ 30 μl 的 3 M 醋酸钠 (pH 5.0)，将溶液的颜色调为黄色后再进行后续操作。

- 2) 胶块完全溶解后最好将胶溶液温度降至室温再上柱, 吸附柱在较高温度时结合 DNA 的能力较弱。
5. 可选步骤: 当回收片段 < 300 bp 时, 应加入 1/2 胶体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。
6. 将步骤 4 或 5 中所得溶液加入到平衡好的吸附柱 (Pure Columns GP with Collection tubes) 中, 室温放置 2 min, 13,000 rpm 离心 60 s, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。(注: 吸附柱容积为 750 μ l, 若样品体积 > 750 μ l 可分批加入)
7. 向吸附柱中加入 600 μ l PW Buffer (使用前检查是否加入无水乙醇), 13,000 rpm 离心 60 s, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。(注: 如果纯化的 DNA 用于平末端连接实验或直接测序, 建议加入 PW Buffer 后静置 2 ~ 5 min 再离心)
8. 重复步骤 7 一次。
9. 13,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液。将吸附柱开盖置于室温数分钟, 以彻底晾干, 去除残留乙醇。
10. 将吸附柱放置于一个新的 Nuclease-free 离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 30 ~ 50 μ l YEB Buffer, 室温放置 2 min。13,000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 溶液, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

● PCR 产物回收方案

该方案适合从 PCR 产物, 酶促反应液, 或粗制的 DNA (包括基因组 DNA) 中回收纯化 DNA, 可高效去除各种核苷酸, 引物, 引物二聚体, 盐分子, 酶等杂质。

1. 短暂离心 PCR 产物/酶促反应液, 或粗制 DNA 产物 (包括基因组 DNA)。用移液枪测量其体积, 并转移至灭菌的 1.5 ml 离心管中。加入 5 倍体积的 YB Buffer, 充分混匀 (无需去除石蜡油或矿物油)。
2. 后续步骤按照琼脂糖凝胶回收方案中的步骤 5~10 进行操作。

注:

- 1) 洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液, 应保证其 pH 值在 7.0 ~ 8.5 之间 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围)。
- 2) 如需提高 DNA 量, 可将离心得到的溶液重新加到吸附柱中, 室温放置 2 min, 13,000 rpm 离心 1 min。
- 3) 洗脱体积不应 < 30 μ l, 体积过少会影响回收效率。
- 4) 回收 > 10 kb 的 DNA 片段时, YEB Buffer 应在 56 $^{\circ}$ C 水浴预热, 适当延长吸附和洗脱时间, 可增加回收效率。

常见问题及解决方案

常见问题	原因	解决方案
DNA 回收率低	1.琼脂糖凝胶未完全溶化	尽可能去除不含目的片段的琼脂糖凝胶，溶胶过程间隔性的颠倒混匀促进凝胶充分溶化，仔细检查确保无固体琼脂糖凝胶残留。
	2.回收片段过小	小于或等于 100 bp 片段时，加入 1 倍体积的异丙醇。
	3.试剂准备有误	PW Buffer 需加入无水乙醇稀释或乙醇体积不准确。
	4.洗脱效率低	将 YEB Buffer 预热至 56°C，并进行二次洗脱。
	5.溶解液 PH 值过高	如 PH 值过高，可向其中加入 10 ~ 30 μ l 的 3 M 醋酸钠 (pH 5.0)，将 pH 值调到 5 ~ 7。如进行琼脂糖凝胶回收实验，则需保证 YGP 溶胶指示液为黄色。
下游实验不理想	1.洗脱产物中有 ssDNA	将洗脱产物 95°C 加热 2 min，缓慢冷却至室温，使单链 DNA 重新退火即可。
	2.盐污染	确保用 PW Buffer 漂洗两次；此外沿吸附柱管壁四周加入 PW Buffer，或加入 PW Buffer 后盖盖颠倒混匀 2 ~ 3 次有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐污染。