



Shanghai Promega Biological

# 技术手册

**Eastep™ 凝胶及PCR 回收试剂盒**  
(**Eastep™ Gel and PCR Clean-up Kit**)

产品目录号：LS1020/LS1022

## 目录

1. 描述.....	1
2. 试剂盒组分和储存条件 .....	1
3. 一般注意事项 .....	2
4. 琼脂糖凝胶块和 PCR 扩增产物的准备和处理.....	2
4.1 准备膜清洗液.....	3
4.2 融解凝胶块.....	3
4.3 处理 PCR 扩增产物 .....	4
5. DNA纯化(离心法) .....	4
6. 常见问题分析.....	6
7. 试剂配方.....	7

## 1. 描述

Eastep™ 凝胶及PCR回收试剂盒适用于从标准琼脂糖凝胶、低熔点琼脂糖凝胶或PCR扩增产物中提取并纯化长度为100bp-10kb的DNA片段。回收效率取决于DNA片段的大小，最高可达95%（见表1）。纯化PCR扩增产物可有效去除残留的核苷酸及引物。该系统利用硅胶膜可结合高达20 μg的DNA。纯化DNA片段或PCR扩增产物所需的时间取决于处理样品的数量及操作步骤，一般可在20分钟内完成。纯化的DNA可直接用于自动荧光测序、克隆、标记、扩增、限制性酶切及体外转录和翻译。

Eastep™ 凝胶及PCR回收试剂盒可用于线性双链DNA片段、超螺旋质粒DNA、单链线性DNA或单链环状DNA。单链DNA的纯化产量会比双链DNA的产量低。

双链DNA 片断	回收率
55bp	>26%
70bp	>39%
85bp	>55%
100bp	>84%
500bp	>89%
1,000bp	>92%
3,199bp	>95%
9,416bp	>95%
23,130bp	>47%

表1 不同片段大小双链DNA的回收率

实验验证过程中使用的上片段中，小于或者等于1000bp的片段为PCR扩增产物，大于1000bp片段都是质粒。

## 2. 试剂盒组分和储存条件

产品	规格	目录号
Eastep™ 凝胶及PCR回收试剂盒	50次	LS1020
仅供科研用途 组分		
Membrane Binding Solution	20ml	GP202A
Membrane Wash Solution	15ml	GP201A
Nuclease-Free Water	13ml	SP119G
Minicolumns and collection Tubes	50个/包	SR320A

产品	规格	目录号
Eastep™ 凝胶及PCR回收试剂盒	250次	LS1022
仅供科研用途 组分		
Membrane Binding Solution	100ml	GP202B
Membrane Wash Solution	75ml	GP201B
Nuclease-Free Water	13ml	SP119G
Minicolumns and collection Tubes	250个/包	SR320B

储存条件：将所有组分储存于室温（22-25℃），无需冷藏。Membrane Binding Solution需避光保存。有效期见产品标签。

### 3. 一般注意事项

琼脂糖是一种从海藻中提取的线性聚合多糖，通常用于电泳时分离核酸。标准的琼脂糖熔点为 87-89°C，凝固点为 36-39°C。在低熔点的琼脂糖中，羟乙基基团被引入到多糖链，导致琼脂糖的熔点和凝固点都变得很低(分别为 65°C和 24-28°C)。通常回收完整 DNA 片段时用低熔点琼脂糖。在不用改变操作方法的前提下，Eastep™ 凝胶及 PCR 回收试剂盒可以从标准琼脂糖胶块和低熔点琼脂糖胶块中回收纯化 DNA。

Eastep™ 凝胶及 PCR 回收试剂盒可以与 PCR 反应中的多种扩增酶、缓冲液和 PCR 反应体系优化添加剂兼容。石蜡油不会干扰分离纯化。

安全防护措施：用溴化乙锭染色及在紫外灯下切胶时必须穿实验服，带手套。快速操作，避免暴露在紫外灯下的时间过长，同时尽可能避免切割到 DNA。

### 4. 琼脂糖凝胶块和 PCR 扩增产物的准备和处理（溶液配制见第7章节）

- 1.5ml 离心管
- 95%乙醇
- 琼脂糖胶（标准熔点或低熔点胶）
- 1×TAE 或TBE 电泳缓冲液
- 50-65°C加热

#### 4.1 准备膜清洗液

开始试验之前,按表2所示将95%乙醇(用户自备) 加到膜清洗液试剂瓶中,并在瓶上标明已加入乙醇。每次使用后务必盖紧瓶盖以防止挥发。

表2. 不同规格产品需加入95%乙醇的体积。

规格	膜清洗液 (产品编号)	需加入的95%乙醇的体积
50次	GP201A	75ml
250次	GP201B	375ml

#### 4.2 融解凝胶块

1. 使用适当的标准熔点琼脂糖或低熔点琼脂糖和TAE或TBE电泳缓冲液进行DNA电泳。
2. 取与样本数相同的若干1.5ml离心管,分别编号称量后记录下重量。
3. 使用染料如溴化乙锭对DNA进行染色。在较长波长紫外灯下,以干净刀片切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶块,尽量减小凝胶块的体积。为防止DNA损伤,要尽量缩短DNA暴露在紫外灯下的时间。
4. 将切下的凝胶块转入已称重的离心管中,再称重后减去空离心管的重量,得到凝胶块的重量。

注意:放置于无核酸酶的离心管中的凝胶块可在4°C或-20°C储存一周,请务必盖紧离心管盖子。

5. 按照每10mg凝胶块加10 $\mu$ l膜结合液的比率加入足量膜结合液。
6. 振荡混合以上混合物,在50-65°C下孵育10分钟,或直到胶块完全融解。孵育过程中,每隔几分钟振荡离心管以加速胶块的融解。室温短暂离心,使溶液集中于管底。琼脂糖胶一旦融解将不会在室温下固化。

注意:

- 1) 1%高熔点琼脂糖凝胶与1-2%低熔点琼脂糖凝胶的DNA回收率相当。测试过的最高琼脂糖凝胶浓度是3%。如使用高熔点琼脂糖凝胶的且浓度达到2-3%时,需要延长的融解时间且回收率会有所降低。
- 2) 微量纯化柱的单次最大处理量为350mg琼脂糖凝胶(融于350 $\mu$ l膜结合液中)。若凝胶块大于350mg时(按1:1融于结合液中),请分多次上样直到所有样品通过同一个微量纯化柱。每个微量纯化柱累计最多可处理3.5g(10  $\times$  350 mg)琼脂糖凝胶。
- 3) 每个微量纯化柱最多可结合约20 $\mu$ g DNA。
- 4) 凝胶中低至10 ng的DNA,用本试剂盒也可成功纯化。
- 5) 当DNA片段大于5kb时要轻轻混合,以免DNA断裂

注意：对于 $\geq 5$ kb的DNA片段，请不要振荡，应颠倒混。

#### 4.3 处理 PCR 扩增产物

1. 使用标准的扩增条件扩增目的片段。
2. 加入等体积的膜结合液于PCR扩增产物中。

注意：

- 1) 微量纯化柱的单次最大容量为：1ml PCR扩增产物加1ml 膜结合液（共2ml）。如果PCR扩增产物  $> 350\mu\text{l}$ ，请分多次上样，直到所有样品通过同一个微量纯化柱。
- 2) 每个微量纯化柱最多可结合约 $20\mu\text{g}$  DNA。
- 3) PCR反应液中低至10 ng的DNA，用本试剂盒也可成功纯化。
- 4) 石蜡油不会影响DNA纯化。
- 5) 如果扩增反应产生非特异条带，或有明显可见的引物二聚体，建议使用凝胶电泳回收纯化目的DNA。或者用80%乙醇替代试剂盒提供的膜清洗液，以减少纯化产物中的引物二聚体。

## 5. DNA纯化(离心法)

1. 将微量纯化柱装入收集管中。每份样品准备一套。
2. 把融解的凝胶或PCR扩增产物转入微量纯化柱中，并在室温下孵育1分钟。
3.  $16,000\times\text{g}$  ( $14,000\text{rpm}$ ) 离心1分钟。将微量纯化柱从收集管上移开，弃去收集管中的液体后重新装回到收集管上。

注意：若离心力低于 $16,000\times\text{g}$  ( $14,000\text{rpm}$ ) 会导致产率降低。

4. 向微量纯化柱中加入 $700\mu\text{l}$ （已加入95%乙醇）膜清洗液， $16,000\times\text{g}$  ( $14,000\text{rpm}$ ) 离心1分钟。取下微量纯化柱倒掉收集管中的废液后，将微量纯化柱装回收集管上。再加  $500\mu\text{l}$ 膜清洗液， $16,000\times\text{g}$  ( $14,000\text{rpm}$ ) 离心2分钟。
5. 从离心机中取出微量纯化柱-收集管组合，切勿弄湿柱子底部。倒掉收集管中的废液。再次离心微量纯化柱-收集管组合1分钟，离心时不要盖上离心机的盖子（如可以），以使残留的乙醇充分挥发或离心后打开收集管的盖子挥发乙醇。
6. 小心地将微量纯化柱转入干净的  $1.5\text{ml}$  离心管中，加 $50\mu\text{l}$ 无核酸酶水到微量纯化柱中央，切勿触碰到柱内的膜。室温孵育1分钟后， $16,000\times\text{g}$  ( $14,000\text{rpm}$ ) 离心1分钟。
7. 丢弃微量纯化柱，将装有DNA洗脱液的离心管保存于 $4^{\circ}\text{C}$ 或 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

注意：最终得到的DNA 洗脱液体积约为 $42-47\mu\text{l}$ 。如果希望得到浓度更高的DNA，可继续用乙醇沉淀。也可以在DNA 洗脱时仅加 $15\mu\text{l}$ 无核酸酶的水，DNA产量不会下降太多。如果用 $15\mu\text{l}$ 的洗脱体积，请在离心前确保离心柱中的膜已经完全被无核酸酶的水覆盖。不建议洗脱体积低于 $15\mu\text{l}$ （见表3）。

表3: 洗脱体积与相应回收率。纯化700bp PCR产物后用溴化乙锭定量, 每个样品均重复三次。

洗脱体积	回收率 (与50 $\mu$ l洗脱体积相比)
10 $\mu$ l	35%
15 $\mu$ l	98%
25 $\mu$ l	98%
50 $\mu$ l	100%
75 $\mu$ l	100%
100 $\mu$ l	100%

## 6. 常见问题分析

问题	可能的原因和分析
DNA产量低	确认加入了与凝胶块或PCR扩增产物相同体积的膜结合液（10 $\mu$ l PCR产物或10mg凝胶块中加入10 $\mu$ l膜结合液）。
	在进行纯化前必须在50-65 $^{\circ}$ C孵育凝胶块使其完全融化。
	如果被纯化的DNA数量太少，用分光光度计检测不到，建议用电泳或PicoGreen <sup>®</sup> 染色进行检测和定量。
	确认离心时，速度达到16,000 $\times$ g（14,000rpm）。
	确认膜清洗液中已加入乙醇。确认重复2次清洗。
限制性内切酶消化结果差	增加限制性内切酶的量或者延长消化时间。在限制性内切酶的最佳反应缓冲液和适宜的温度下消化DNA。
	在最后洗脱DNA时可能有乙醇或盐类带入。乙醇沉淀DNA或保证DNA的体积只占最终反应体积的10%或更低。
A260/A230 比值低	通常由于异硫氰酸胍污染，使用乙醇沉淀DNA可降低这类污染。
离心柱被堵	延长凝胶块在50-65 $^{\circ}$ C的孵育时间确保凝胶块完全融化。
	确认加入了相同比例的膜结合液到凝胶块中（10mg凝胶块中加入10 $\mu$ l膜结合液）。
琼脂糖凝胶块上的DNA量看起来比光度检测的读数要低。	在DNA洗脱时的痕量污染会影响分光光度计的读数。可选择用EB或PicoGreen <sup>®</sup> 作为染料进行琼脂糖凝胶电泳并确定其浓度。
DNA条带有弥散	DNA可能降解，在混合凝胶块和膜结合液时尽量动作轻柔。
	将凝胶块保存在4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C的无核酸酶的环境中。
	可能被核酸酶污染，电泳缓冲液在使用前进行高压蒸汽灭菌。
克隆效率低	可能有异硫氰酸胍污染。用乙醇沉淀DNA。用70%的乙醇清洗沉淀减少污染。

## 7. 试剂配方

### 1×TBE 缓冲液

89mM Tris 碱  
89mM 硼酸  
2mM EDTA (pH 8.0)

### 1×TE 缓冲液

10mM Tris-HCl (pH 7.5)  
1mM EDTA (pH 8.0)

### 1×TAE 缓冲液

40mM Tris 碱  
5mM 醋酸钠  
1mM EDTA (pH 8.0)