

GeBA 使用说明

GeBAflex-tube Kit 透析管为生物样品制备提供了极为方便、通用的操作系统。该系统包括两种操作模式——透析和电洗脱，能够高效地替换样品缓冲液或从凝胶中抽提蛋白质、DNA 或 RNA。所有操作只需在一支离心管中进行，简单快捷，适合在很多实验条件下使用。样品操作中不再需要注射器，微量离心，专门的电洗脱装置或是重复繁琐的操作步骤，只需实验室常规移液器进行样品的添加和移除即可。GeBAflex-tube Kit 透析管的双膜设计（可以方便地监测样品水分挥发过程）和大表面积使其亦可用来浓缩生物样品。GeBAflex-tube Kit 透析管按容量不同分为几种型号：**Mini** 型（10-250 μ l），**Midi** 型（50-800 μ l），**Maxi** 型（500-3000 μ l）和 **Mega** 型（分别有 3-10ml，10-15ml，15-20ml 三种载样体积）。

Maxi 型号的 GeBAflex-tube Kit 透析管试剂盒中包括两个盖子，可以方便将透析管的容量分别调节为 500-200 μ l 和 2000-3000 μ l。Mega 型透析管的截留分子量有两种，以不同颜色区分：3.5kDa（蓝色）和 6-8kDa（粉色）；Mega 型透析管也配有不同的管帽，以方便地根据需要调整最大载样体积。底管则决定了它的截留分子量，相同颜色的底管（具有相同的截留分子量）可以与不同的管帽（具有不同的最大载样体积）组合使用的（如图 1）。

所有 GeBAflex-tube 透析管膜都是经超级净化、EDTA 处理过的再生纤维素膜，不含硫与重金属。用浓度为 35-70 μ g/ml 的酸性、中性或碱性蛋白做测试，证实此种透析管膜对蛋白质的非特异吸附可忽略不计。

除了用于透析，GeBAflex-tube 透析管还可以从变性或非变性聚丙烯酰胺凝胶中特异、有效地抽提和电洗脱蛋白质、蛋白-蛋白和蛋白-核酸复合物，所有操作仅需 2 小时，并可在从二维双向电泳中高效回收蛋白的同时去除样品中的两性电解质。纯化出的蛋白可以用于 MALDI-MS，动物免疫制备抗体（前提是蛋白样品经过透析去除已有缓冲体系），HPLC 或肽谱分析。另外，GeBAflex-tube 透析管还能够用来从聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶中回收寡聚核苷酸，RNA 和 DNA。它的适用范围包括从 15 个残基的寡核苷酸到 80kbp 的双链 DNA。特别方便的是：用 GeBAflex-tube 透析管操作不需要专门的电洗脱装置，GeBAflex-tube Kit 透析管配套试剂盒中提供了适用于三种型号透析管（Mini, Midi, Maxi）的支架，可与多数常用的水平电泳仪兼容。试剂盒同时提供蛋白和核酸沉淀试剂，以及优化过的从纯化后的蛋白样品中彻底去除 SDS 的缓冲液，使之可以用于之后的 MALDI-MS 分析。

注意：Mega 型透析管一般不用于电洗脱抽提 DNA 和 RNA 样品！

从琼脂糖凝胶中回收 DNA 或 RNA	>90%
从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 或 RNA	>90%
从 SDS-PAGE 中回收蛋白质	>60%

表 1 电洗脱后的样品回收效率电洗脱后的样品回收效率

试剂盒组分 (Mini/Midi/Maxi)

GeBAflex-tube Dialysis & Extraction kit (2)

即 GeBAflex-tube 电洗脱配套试剂盒 (2) 试用装

- 2 个 GeBAflex-tube 透析管 (Mini, Midi 或 Maxi) 已安放在白色透析管支架上
- 1 个 浮架 (可插 4 只小管, 漂浮于替换的缓冲液上)
- 1ml 质谱分析用沉淀缓冲液 (MS-Buffer); 2ml 20%三氯乙酸 (TCA) • 5ml 3M 醋酸钠溶液 (KAc), pH5.2; 装于独立小袋内。



GeBA EZ-Tube 应用：从凝胶中抽提核酸

从聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶中抽提DNA或RNA的操作步骤：

1. 取下透析管帽并按照表5所示加入适量去离子水，竖直放置孵育5分钟以上，轻轻旋上管帽。

注意：加入样品前预浸润透析管膜是非常重要的，不要跳过步骤1。因为干的膜会吸收水分，造成透析管中水体积的减少。也不要触摸或挤压透析管膜，以免造成膜的损坏。并且仔细检查膜是否漏水。膜再次放干之后，建议不要继续再使用。

2. 用干净锋利的刀片将含有DNA或RNA的部分切下，并修切掉多余的凝胶。

3. 取下管帽并用移液器把去离子水从透析管中取出，小心不要刺破透析膜。将切割好的凝胶放入透析管中，每个不同型号透析管中能装的最大凝胶体积如表1所示。加电洗脱缓冲液至膜的上端（所加缓冲液体积请参照表1）。添加缓冲液时应避免引入气泡，这样会干扰电洗脱过程。轻轻旋上管帽。

注意：电洗脱时使用与凝胶电泳分离相同的缓冲液，将大块的凝胶分别装在不同的透析管内。

4. 将透析管放在专用配套支架上（见图1）。透析管两侧的膜必须与电泳区垂直以保证电流可以通过透析管。



图1：在支架上放置Midi型EZ-Tube透析管示意图。透析管两侧的膜必须与电泳区垂直以保证电流可以通过透析管。

5. 将装有透析管的支架放入水平电泳槽内（例如用来做DNA琼脂糖凝胶电泳的电泳槽），加入电洗脱缓冲液。

表1 不同型号透析管的电洗脱参数

EZ-Tube透析管	加入去离子水体积	最大凝胶块体积	加入电洗脱缓冲液体积
Mini	0.25ml	0.4cm × 1.1cm	0.25ml
Midi	0.8ml	0.5cm × 1cm	0.7-0.8ml
Maxi	2.5-3.0ml	2cm × 1cm	2.5-3.0ml

6. 电泳槽两端加上电压（通常80-150V）开始电洗脱，直到核酸都从凝胶切块中分离出来。通常用的电泳时间请参照表2。每次洗脱的最优电泳时间根据样品特点和凝胶浓度而不同，需要用户自行摸索。常用的电洗脱时间请参考表6-8。

小技巧：如果凝胶用溴化乙锭或SYBR® Green染色，可以用便携式或台式紫外灯监控核酸抽提进程（推荐：DNR迷你型凝胶成像仪MicroBIS）。

7. 将电极反接继续电洗脱2分钟，使核酸从透析管的膜上脱离。

8. 轻轻打开透析管，在膜内侧缓慢地上下吸取电洗脱液至少5次，小心避免吸到凝胶块并不要戳破透析管膜。将洗脱液转移至另一干净的离心管。

9. 14,000 × g离心洗脱液1分钟使凝胶残留物沉淀。

10. 将上清转移至另一干净的离心管中，用常规标准方法浓缩样品或参考下文的核酸沉淀沉淀操作流程。

表2. 100V电压条件下, 从10%SDS-PAGE (29:1聚丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺) 中电洗脱蛋白所需最少时间

蛋白分子量 (kDa)	时间 (分钟)		
	Mini型	Midi型	Maxi型
14	30-40	35-45	50-60
18.4	35-45	*	55-65
19-26	*	45-55	*
25	40-50	*	70-80
29	*	55-65	*
35	50-60	*	110-120
40	*	60-70	*
45	55-65	65-75	130-140
50	*	75-85	*
66	70-80	85-95	150-160
81	*	105-115	*
116	90-100	120-130	180-190
128		140-150	*

*未测定

洗脱时间——核酸

电洗脱时间受多种因素影响, 包括洗脱核酸片段大小, 所用电压, 凝胶切块大小, 凝胶浓度以及聚丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺配比。表3-5列出了从聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶中抽提不同大小DNA和RNA所需的时间。

重要: 每个样品所需的最优电泳时间是不同的

表3. 100-150V电压条件下从自然或变性4%聚丙烯酰胺凝胶 (29:1聚丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺) 中电洗脱不同大小DNA片段所需最少时间。

DNA片段大小 (bp)	时间 (分钟)		
	Mini型	Midi型	Maxi型
100	10-15	10-20	10-15
200	15-20	*	15-20
300	*	15-25	*
500	30-35	20-30	30-35
822	*	25-35	*
1000	55-60	*	55-60
1044	*	30-40	*
1400	75-80	*	75-80
2700		45-55	*

*未测定

表4. 100-150V电压条件下从自然或变性4%聚丙烯酰胺凝胶（29:1聚丙烯酰胺：甲叉双丙烯酰胺）中电洗脱不同大小RNA片段所需最少时间。

RNA片段大小 (bp)	时间 (分钟), Midi型
100	15-25
400	25-35
600	35-45
1000	45-55

表5. 80-110V电压条件下从1%琼脂糖中电洗脱不同大小DNA片段所需最少时间。

DNA片段大小 (bp)	时间 (分钟)		
	Mini型	Midi型	Maxi型
100-200	*	10-20	*
500-700	10-15	15-20	10-15
1000	15-20	20-30	15-20
2000	25-30	*	25-30
4361	*	25-35	*
5000	40-45	*	40-45
6557	*	45-55	*
8000	50-55	*	50-55
9416	*	55-65	*
10000	55-60	*	55-60
23130	*	70-80	*

*未测定

GeBA EZ-Tube 应用：核酸沉淀

EZ-Tube电洗脱配套试剂盒提供的3M醋酸钠, pH5.2溶液可以有效地沉淀电洗脱后的核酸样品。流程如下:

1. 向核酸样品中加入0.1倍体积的3M醋酸钠, pH5.2溶液和2倍体积的100%乙醇或1倍体积100%异丙醇, 轻轻振荡混匀。
2. 室温孵育5分钟。
3. 14,000 × g离心5分钟, 吸掉上清并用70%乙醇洗沉淀, 轻轻振荡并重复70%乙醇清洗。
4. 吸走上清, 用100%乙醇洗沉淀并如步骤3中离心。吸掉上清后, 风干沉淀使乙醇挥发干净, 将沉淀重溶于去离子水或其他缓冲液中。