

无内毒素质粒超大量提取试剂盒 (Mega 10) 简明说明书 (PD1617)

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, DNA Unit 高效吸附 DNA, 同时蛋白质和其他杂质通过漂洗液去除。核酸最终通过无菌水或者 EndoFree Elution Buffer 洗脱。

不同于其他试剂盒, 我们的试剂盒缓冲液系统内不含离液盐, 纯化后的质粒 DNA 不含胍盐/阴离子交换树脂残基, 可用于下游应用, 例如转染、限制酶图谱、文库筛选、测序以及基因治疗和基因疫苗。纯化后的质粒内毒素含量低于 0.1 EU (内毒素) / μg 的 DNA。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	1	2	10
DNA Unit	1	2	10
Filter Unit	1	2	10
Replacement Cup	1	4	20
Buffer GBL	50 mL	100 mL	500 mL
Buffer A1	110 mL	220 mL	2 x 530 mL
Buffer B1	110 mL	220 mL	2 x 530 mL
Buffer C1	130 mL	260 mL	3 x 450 mL
DNA Wash Buffer*	24 mL	54 mL	3 x 80 mL
RNase A (20 mg/mL)	550 μL	1.1 mL	4 x 1.5 mL
EndoFree Elution Buffer	30 mL	60 mL	270 mL
EndoClean Buffer	3 mL	6mL	30 mL
User Manual	1	1	1

要点

- **RNase A:** 室温下 (15-25°C) 可稳定贮藏一年。使用前将提供的所有 RNase A 瞬时离心后加入 Buffer A1, 使用后 Buffer A1/RNase A 置于 4°C 保存。
- **DNA Wash Buffer:** 使用前请将 96 mL (PD1617-00) 或 216 mL (PD1617-01) 或 320 mL (PD1617-02) 96-100% 乙醇加入至 DNA Wash Buffer 瓶内。
- **Buffer B1:** 低于室温时会沉淀, 请于 37°C 水浴加热至沉淀完全溶解, 溶液澄清。使用后保证 Buffer B1 瓶盖拧紧。
- **Buffer C1** 在低于 10°C 时可能形成沉淀, 使用前请于 37°C 温浴溶解。
- **Buffer A1: B1: C1:** 100% 乙醇=1:1:1.2:1.2。
- 确保离心机和负压装置的可用性, 特别是当裂解液与乙醇混合后, 需要立即负压处理。
- 在室温下 (15-25°C) 进行所有离心操作。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自购买之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。加入 RNase A 的 Buffer A1 应储存于 4°C。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 泵驱动的负压装置, 500 mL 或 1,000 mL 瓶 (Corning#430518 或 430282)
- 50 mL 无菌管

- 高速离心管 (用于内毒素去除)

操作步骤

1. 接种新鲜的 500 μL 菌液到 **1,200-1,800 mL** LB 培养基 (含适量抗生素), 37°C 震荡培养 14-16 h。

注: 制备初始培养菌液的最佳方法: 从新鲜的选择性培养基上挑取新鲜的单菌落至含有适量抗生素的 1 mL LB 培养基内, 37°C, 震荡 (约 250 rpm) 培养 6-8 h。若超过 1,500 mL 菌液量, 对应 Buffer 的使用量应加大。

注: 不要使用 4°C 储存的菌液作为初始菌液。也不要使用冻存的甘油菌直接震荡培养。

2. 5,000 $\times\text{g}$ 离心 10 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。柱平衡: 向 **DNA Unit** 中加入 **50 mL Buffer GBL**, 打开负压装置抽滤 1 min。

注: 完全去除残留培养基有利于最佳细胞裂解和中和。

3. 加入 **100 mL Buffer A1** (使用前加入 RNase A), 用移液器或涡旋震荡仪充分悬浮细菌细胞。

注: 充分重悬有利于最佳产量的获得。

4. 加入 **100 mL Buffer B1**, 轻轻地反转 10 次以混匀, 室温静置 5 min 直至溶液澄清。不要孵育超过 5 min。

5. 加入 **25 mL Buffer C1**, 立即反转 5 次直至白色漂浮物形成。涡旋 5 s。

注: 混合均匀非常必要, 若混合物依旧呈团块、褐色、粘稠, 需要更多地混匀以完全中和。

6. 室温静置 10 min, 加入 **95 mL Buffer C1**, 颠倒混匀 2 次, 静置 2 min。

7. 将双层 **Filter Unit** 连接至一个无菌的 500 mL 或 1,000 mL 标准瓶 (Corning#430518 或 430282 或同等规格的耐热玻璃瓶) 上

并拧紧。将该装置连接至泵驱动的负压装置上。

8. 转移混合液底部澄清的裂解液（使用一个 50 mL 的移液管）至 **Filter Unit**，静置 5 min，打开负压装置，起初使用低压，5 分钟后升至最大负压。

注：低的负压可防止滤膜堵塞。

注：使用 50 mL 移液管将相对澄清的裂解液从瓶底转移至 **Filter Unit**。这将加快 **Filter Unit** 的流速。正常情况下，约 270 mL 的裂解液可在 10-15 min 内通过 **Filter Unit**。当大部分裂解液已被过滤后，将剩余的白色漂浮物倒入 **Filter Unit**。

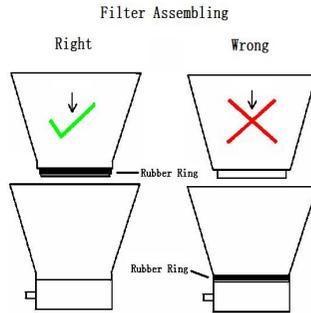


图 1. 过滤装置组装图

注：若流速过慢，关闭负压装置，静置 1 min。小心拆卸下上层的 **Filter Cup**，用 **Replacement Cup** 替代。如图 1 所示组装。将裂解液从原来的过滤杯倒入替换的 **Replacement Cup**，打开负压装置，过滤剩余的裂解液。

9. 待大部分滤液通过过滤装置后，关闭负压装置，等待 1 min，拆卸装置，弃 **Filter Unit**。

注：此时 DNA 在收集瓶内。

10. 将 **DNA Unit** 连接至 500 mL 或 1,000 mL 标准瓶，并拧紧。在负压装置关闭状态下将 **DNA Unit** 连接上去。加入 120 mL 无水乙醇至步骤 8 的滤液，手动剧烈震荡 3-5 次，快速将混合液转移至 **DNA Unit** 并打开负压装置。

11. 将剩余的混合液倒入 **DNA Unit**，当所有裂解液通过 **DNA Unit** 后，打开负压装置抽滤 1 min。

12. 加入 **50 mL DNA Wash Buffer**，最大负压真空抽滤 1 min。重复步骤 12。

13. 在 **DNA Unit** 中加入 80 mL 100%乙醇，开启最大负压维持 1 min，关掉负压装置，静置 1 min，倒掉瓶子中的废液，将 **DNA Unit** 重新连接至标准瓶上，开启负压装置至最大负压，真空抽 20 min，以充分去除残留的乙醇。关掉负压装置，移去标准瓶，将 **DNA Unit** 置于 65°C 烘箱中放置 20 分钟，以充分去除残留的乙醇。

14. 静置 1 min，将 **DNA Unit** 连接至一个新的 50 mL 无菌管，并旋紧。

15. 加入 **12 mL EndoFree Elution Buffer** 至 **DNA Unit** 膜上，室温静置 2 min，打开负压装置洗脱 DNA。此时会收集到 6-8 mL 洗脱液，这是 1st 洗脱液。

16. 关闭负压装置，将 **DNA Unit** 连接至一个新的 50 mL 无菌管，加入 **8 mL EndoFree Elution Buffer** 至 **DNA Unit** 膜上。室温静置 1 min，打开负压装置洗脱 DNA。此时会收集得到 4-5 mL 洗脱液，这是 2nd 洗脱液。

注：纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如基因克隆，RFLP，文库构建，体外翻译，测序，HEK293 细胞的转染等。

注：若用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射，强烈建议去除内毒素。

注：二次洗脱可获得最大的 DNA 产量。为了最大得率和更高浓度，将洗脱液混合，加入 0.1 倍体积的 3 M KAc 或 NaAc (pH5.2) 和 0.7 体积异丙醇。混合均匀后，高速离心 10 min。弃上清液，再加入 1 mL 70%乙醇，离心 5 min，小心弃上清，干燥沉淀 10-20 min，用 **EndoFree Elution**

Buffer 或无菌 ddH₂O 重悬 DNA。

注：使用更少体积的 **EndoFree Elution Buffer** 可得到更高的浓度。

内毒素去除步骤

该步骤用于质粒纯化后内毒素去除。

1. 加入 **0.1 倍体积** 的 **EndoClean Buffer** 至含质粒样品的 30 mL 无菌高速离心管（例如，加入 1 mL **EndoClean Buffer** 至 10 mL 质粒样品）。

2. 涡旋几次，冰上静置 10 min，直至溶液澄清不浑浊。（若可行的话，建议将样品置于冷室震荡 10 min）颠倒混匀。

3. 65°C 孵育 5 min，溶液又变得浑浊。室温 12,000 ×g 离心 5 min。若离心温度低于 23°C，将不会见到分层现象。

注：若离心后没有见到分层现象，加入 1/10 体积的氯仿，涡旋混匀 20 s，室温 12,000 ×g 离心 5 min。

4. 小心转移上层裂解液至另一个高速离心管内。

5. 加入 0.1 倍体积的 3 M KAc (pH5.2) 或 NaAc (pH5.2) 和 0.7 倍体积的异丙醇，沉淀质粒 DNA。

6. 12,000 ×g 离心 10 min，小心弃上清。

7. 加入 5 mL 70%乙醇，12,000 ×g 离心 5 min，小心弃上清，室温干燥 10-20 min。

8. 加入 **3 mL EndoFree Elution Buffer**，重悬质粒 DNA。

注：纯化后的 DNA 可用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染和显微注射。

低拷贝质粒/柯斯质粒的纯化

从过夜培养的菌液中纯化得到的低拷贝质粒的得率大约为 0.1-1 μg/mL，若要提取中低拷贝数的质粒 DNA，请遵循以下准则：

- 培养体积：使用高拷贝质粒菌培养基的 2 倍体积。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, C1, 以及 100%乙醇, Buffer A1, B1, C1 可单独向 Biomiga 购买。
- 使用与高拷贝质粒菌相同体积的 DNA Wash Buffer , EndoFree Elution Buffer。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
低得率	裂解不完全	加入 Buffer B1 后充分混匀。 如果瓶盖没拧紧, 重配 Buffer B1(0.2 M NaOH 和 1% SDS).
	菌液过度培养或不新鲜	菌液培养 12-16 h 为佳, 若当天来不及纯化, 将菌液离心后收集菌体保存于 -20°C。请勿将菌液置于 4°C 过夜。
	质粒拷贝数低	增加培养基和 Buffer A1, B1, C1 和 100%乙醇的体积 (1:1:1.2:1.2)。
没有 DNA	质粒在宿主菌内丢失	准备新鲜的菌液。
基因组污染	加入 Buffer B1 后超 5 min	加入 Buffer B1 后不要剧烈震荡, 孵育时间不要超过 5 min。
RNA 污染	RNase A 没加入至 Buffer A1	在 Buffer A1 中加入 RNase A。
质粒跑出点样孔	乙醇没去干净	洗脱前确保没有乙醇残留. 如果必要的话, 可再次离心。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA (中国)

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com



倍沃医学