

无内毒素质粒中提过滤法试剂盒 II 简明说明书 (PD1418)

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, Midi Column 高效吸附 DNA, 同时蛋白质和其他杂质通过漂洗液去除。不同于市场上其他试剂盒, 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。

传统方法分离的质粒通常含有高水平的内毒素 (脂多糖), 对于内毒素敏感细胞系转染或显微注射, 应先清除内毒素。该系统使用一种特殊配方的缓冲液, 可从质粒 DNA 中提取内毒素。两轮提取可将内毒素水平降低至 0.1 EU 每 1 µg 质粒 DNA。本试剂盒为传统纯化工艺提供了一种高效的内毒素去除步骤, 可用于制备转染级质粒 DNA。

本试剂盒适用于从 50-100 mL 大肠杆菌培养液中快速提取质粒, 提供的 Midi Column 可结合至多 400 µg 质粒 DNA。

纯化得到的无内毒素质粒可用于下游应用, 例如内毒素敏感细胞系、原代培养细胞的转染或显微注射。

实验前准备

提供了可供选择的内毒素去除步骤, 方法 A 在纯化质粒过程中去除内毒素, 方法 B 在质粒纯化之后去除内毒素。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存

于室温 (15-25°C)。加入 RNase A 后的 Buffer A1 后应储存于 4°C。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Midi Columns	2	10	25
Buffer GBL	7.5 mL	30 mL	70 mL
Filter Syringe (20 mL)	2	10	25
Buffer A1	12 mL	60 mL	140 mL
Buffer B1	12 mL	60 mL	140 mL
Buffer N3	16 mL	80 mL	200 mL
EndoClean Buffer	4 mL	20 mL	50 mL
DNA Wash Buffer*	5 mL	24 mL	54 mL
RNase A (20 mg/mL)	60 µL	300 µL	700 µL
Endofree Elution Buffer	6 mL	30 mL	100 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, 使用后请将 Buffer A1/RNase A 置于 4°C 保存。
- **DNA Wash Buffer:** 使用前请将 20 mL (PD1418-00) 或 96 mL (PD1418-01) 或 216 mL (PD1418-02) 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 N3** 低于 10°C 可能形成沉淀, 使用前请于 37°C 水浴加热溶解。

- 确保离心机转速, 特别是当裂解液与乙醇混合后, 需要立即离心处理。
- 建议离心机转速为 5,000 x g, 若收集管不适合高速离心机转子, 可使用台式离心机, 以 2,500 x g 离心双倍时间。
- 在室温下 (15-25°C) 进行所有离心操作。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 高速离心机, 30 mL 高速离心管
- 15 mL 和 50 mL 锥形管

操作步骤 (离心法)

A. 质粒提取过程中去除内毒素

1. 接种新鲜的 50 µL 菌液到 **50-100 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。

注: 请勿使用保存在 4°C 的菌液作为初始菌液。

注: 请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

注: 请勿使用超过 50 mL 的菌液或者细胞量大于 150。

2. 柱平衡: 向吸附柱 **Midi Column** 中加入 **2.5 mL Buffer GBL**, 8000 rpm 离心 1 分钟, 弃去收集管中的滤液, 将吸附柱重新放回收集管中备用。(处理完请于当天使用)。

3. 5,000 x g 离心 10 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。

4. 加入 **5 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。(充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的)

5. 加入 **5 mL Buffer B1**, 轻轻地反转 5 次以混匀 (不要涡旋), 室温静置 5 min 直至获得澄清的裂解液。

注: 静置时间不要超过 5 min, 时间过长会导致基因组污染或质粒损伤。

6. 加入 **1.2 mL Buffer N3**, 立即反转 5 次, 手动震荡 5 次混匀。

注: 若混合物仍然呈团块、褐色、粘稠状, 一定要混合均匀, 需要更充分混匀来完全中和。

7. 可选 1: 转移裂解液至高速离心管, 12,000 x g 离心 10 min。小心转移澄清上清液至 15 mL 管 (避免吸到漂浮的沉淀物)。

注: 若转子是冷的, 可将裂解液于室温孵育 10 min 再离心。

可选 2: 将 **Filter syringe** 插入至置于架子上的一个干净的 15 mL 离心管(自备), 将裂解液直接倒入 **Filter syringe**, 静置 10 min。可看到白色沉淀物漂浮在上方。将 **Filter syringe** 固定在 15 mL 管上方, 轻轻推动柱塞, 将裂解液排出, 当阻力过大可停止, 不要强迫裂解液通过 **Filter syringe**, 可能会有些裂解液仍留在絮状沉淀中。

8. 小心将上清液转移至一个干净的高速离心管中, 加入 **0.1 倍体积**的 **EndoClean Buffer**, 涡旋混匀 10 s, 冰上静置 10 min, 期间冰上轻弹管壁几次以混匀。

注: 使用干净的无热原的枪头转移 **EndoClean Buffer**。

注: 加入 **EndoClean Buffer** 后, 在室温 (>23°C) 下样品会变得浑浊。冰上孵育后样品又会变得澄清。

9. 8000 rpm, 室温 (必须>23°C) 离心 10 min (另一种方法是, 样品可在 15 mL 锥形管内, 8000 rpm 离心 15 min), 此时溶液将

分成 2 层, 上层清液含 DNA, 下层有机相含内毒素。若环境温度低于 23°C, 溶液将不会分成 2 层。

注: 离心后若没有观察到分层:

- 65°C 孵育 5 min, 溶液又变得浑浊, 重复步骤 8。
- 或者加入 200 μ L 氯仿 (37°C), 涡旋混匀, 重复步骤 8。

注: 约 99%的内毒素可通过 **EndoClean Buffer** 一次去除。若要求内毒素水平低于 0.1 EU/ μ g DNA, 可重复步骤 7-8。

10. 转移澄清的裂解液, 避免吸到有颜色层, 至一个 15 mL 管内。加入 **6 mL Buffer N3** 和 6 mL 的无水乙醇, 手动震荡 5 次以混匀。

11. 转移 6 mL 的混合液至 **Midi Column** (插在 **15 mL Collection Tube**), 8000 rpm 离心 1 min。弃滤液, 将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**。重复步骤 10 直至所有混合液通过。

12. 加入 **5 mL DNA Wash Buffer**, 8000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**, 重复步骤 11。

13. 加入 3 mL 无水乙醇, 8000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**。

14. 打开柱盖, 8000 rpm 离心 10 min。该步骤可去除残留乙醇, 以便获得最佳洗脱。65°C 烘干 10 min 将有利于去除乙醇并增加洗脱效率。

注: 开盖离心有助于更有效地去除残留乙醇, 建议使用高速离心机 (>5,000 x g)。完全去除残留乙醇非常必要。

15. 将 **Midi Column** 转移至一个干净的 15 mL 离心管, 在膜中央加入 **0.5-1.0 mL Endofree Elution Buffer**, 静置 1 min, 8000 rpm 离心 5 min 洗脱质粒 DNA。若想获得更高产量, 可将洗脱下来的液体重新上柱, 室温静置 1 min 后离心。

注: 二次洗脱可增加 DNA 产量, 若想获得更高浓度, 可使用更少的

Endofree Elution Buffer 洗脱。

注: 纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如克隆/亚克隆、RFLP、文库构建、体外翻译、测序、转染及显微注射。

B. 质粒提取后去除内毒素

1. 按照离心步骤 1~6 进行操作。

2. 小心转移上清液至 15 mL 管, 加入 **6 mL Buffer N3** 和 6 mL 的无水乙醇, 混匀, 按照步骤 10-15 操作。

3. 质粒纯化完成后, 加入 **0.1 倍体积**的 **EndoClean Buffer** 至含有质粒样品的 2 mL 离心管内 (例如, 加入 0.1 mL **EndoClean Buffer** 至 1 mL 质粒样品), 溶液变得浑浊。

4. 涡旋 5 s, 冰上静置 10 min, 冰上混匀样品几次, 冰浴后溶液变得澄清。

5. 8000 rpm 离心 10 min (离心温度需高于 23°C 用以分层)。

注: 离心后若没有观察到分层,

- 65°C 孵育 5 min, 重复步骤 5;
- 加入 200 μ L 氯仿, 涡旋 10 s, 重复步骤 5。

6. 小心转移上层清液至一个 2 mL 管内。

7. 加入 0.1 倍体积的 3 M KAc (pH5.2) 和 0.7 倍体积的异丙醇沉淀质粒 DNA, 8000 rpm 离心 10 min, 小心弃上清液。

8. 加入 2 mL 70%乙醇, 8000 rpm 离心 5 min。小心弃上清液, 干燥 DNA 沉淀 30 min。

9. 用 **Endofree Elution Buffer** 重悬 DNA。

注: 纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如克隆/亚克隆、RFLP、文库构建、体外翻译、测序、转染及显微注射。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，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。小提最高使用 100 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, N3 以及 100%乙醇，Buffer A1, B1, N3 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, N3 和 100%乙醇的体积。
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 后超过 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 没有加入至 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

