

无内毒素质粒小提试剂盒简明说明书（BW-PD1212）

Ver: 1912

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, Mini Column 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 Elution Buffer 洗脱。

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 3-12 mL 大肠杆菌培养液中提取质粒，提供的 Mini Column 可结合至多 80 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℃）。加入 RNase A 后的 Buffer A1 应储存于 4℃。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Mini Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	10	50	250
Buffer GBL	8 mL	30 mL	150 mL
Buffer A1	5 mL	25 mL	115 mL
Buffer B1	5 mL	25 mL	115 mL
Buffer N3	6 mL	30 mL	160 mL
Buffer KB	6 mL	30 mL	130 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	15 mL	3 x 24 mL
EndoClean Buffer	2 mL	10 mL	40 mL
Endofree Elution Buffer	2 mL	10 mL	40 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 µL	125 µL	575 µL
User Manual	1	1	1

要点

- **RNase A:** 室温下（15-25℃）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，使用后将 Buffer A1/RNase A 置于 4℃ 保存。
- **DNA Wash Buffer:** 使用前请将 12 mL（BW-PD1212-00）或 60 mL（BW-PD1212-01）或 96 mL（BW-PD1212-02）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℃ 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。
- 确保离心机转速可以达到 12,000 rpm，在室温下（15-25℃）

进行所有离心操作。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 1.5 mL 和 2.0 mL 无热原的离心管
- 15 mL 离心管
- 小型台式离心机
- 真空负压装置（若使用负压离心步骤）

操作步骤（离心法）

A. 质粒提取过程中去除内毒素

A1: 离心步骤

1. 接种新鲜的单个菌落到 **3-12 mL** LB 培养基（含适量抗生素），37℃ 震荡培养 14-16 h。
2. 12000rpm 离心 1min，弃上清，将管子倒置于纸巾上，去除残留培养基。

注：本说明书操作步骤适用于标准 LB (Luria Bertani) 培养基培养的大肠杆菌中质粒的提取。若采用的是富集培养基，如 TB 或 2xYT，注意 OD₆₀₀ 不要超过 3.0，同时 Buffer A1/B1/N3 应加大使用量。

注：请勿使用保存在 4℃ 的菌液作为初始菌液。

注：请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

注：若没有高速离心管，可使用 15 mL 锥形管，6,000 rpm 离心 10 min。或者，菌液也可以在多个 2 mL 离心管内离心收集。

注：残留的液体培养基容易导致菌体裂解不完全，从而降低产量。

3. 柱平衡：向吸附柱 **Mini Column** 中加入 **500 µL** Buffer GBL，

12,000 ×g 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）。

4. 加入 **450 μL 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：充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的。

5. 加入 **450 μL Buffer B1**，轻轻地反转 10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 5 min。

注：静置时间不要超过 5 min。

注：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。

6. 加入 **100 μL Buffer N3**，立即反转/振荡 5-10 次以混匀。

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. 12,000 rpm 离心 10 min。

注：若裂解液不澄清，将管子转一个角度，再离心 5 min。

8. 小心将上清液转移至 **2 mL Collection Tube** 中，加入 **0.1 倍体积**的 **EndoClean Buffer**，涡旋混匀直至均质化，冰上静置 10 min，期间轻弹管壁几次以混匀。

注：加入 **EndoClean Buffer** 之后溶液将变成红色且浑浊，冰上静置后，溶液变得清澈。

注：使用干净的无热原的枪头转移 **EndoClean Buffer**。

注：加入 **EndoClean Buffer** 后一直在冰上操作，轻弹混匀。

9. 12,000 rpm 离心 10 min（温度必须高于 23°C），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 μL 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/μg 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 2 mL 离心管内。加入 **450 μL Buffer N3** 和 400 μL 的无水乙醇，手动震荡 3 次以混匀。

11. 将 **Mini Column** 插入至 **2 mL Collection Tube**，转移 700 μL 的混合液至 **Mini Column**，12,000 rpm 离心 30 s。弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**，转移剩余的混合液至 **Mini Column**，12,000 rpm 离心 30 s。弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

12. 加入 **500 μL Buffer KB** 至 **Mini Column**，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

注：此步骤对于 **endA+** 菌株而言非常重要，用于去除残留的蛋白质，以获得高质量的质粒 DNA。

13. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**，重复步骤 **13**。

14. 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**，打开柱盖，12,000 rpm 离心 5-10 min。

注：完全去除残留乙醇非常重要，残留乙醇将抑制 DNA 的洗脱。

15. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管，在膜中央加入 **100-150 μL Endofree Elution Buffer**，静置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。将洗脱下来的液体重新上柱，静置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min 洗脱。

注：纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射。

16. DNA 浓度的确定。

浓度（μg/mL）=OD₂₆₀×50×稀释倍数

注：二次洗脱可得到最大的 DNA 产量，若要求高浓度的质粒，可减小 **Endofree Elution Buffer** 的使用量。

B. 负压/离心法

1. 根据制造商指南安装负压设备，将 **Mini Column** 连接到负压装置上。

2. 按照离心步骤 **1-9** 进行操作。

3. 小心转移上清液至 **Mini Column** 中，打开负压装置，允许裂解液通过柱子。

4. 加入 **500 μL Buffer KB**，打开负压装置，允许液体通过柱子。
注：此步骤对于 **endA+** 菌株是必要的，用于去除残留的蛋白质，以获得高质量的质粒 DNA。

5. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer**，打开负压装置，允许液体通过柱子。关闭负压装置。重复步骤 **5**。

6. 将 **Mini Column** 转移至一个 **2 mL Collection Tube**，开盖 12,000 rpm 离心 2 min。

7. 将 **Mini Column** 转移至一个无内毒素的 1.5 mL 离心管，在膜中央加入 **100-150 μL Endofree Elution Buffer**，静置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。将洗脱下来的液体重新上柱，静置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min 洗脱。

注：纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射。

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 1.5 mL 管，加入 500 µL Buffer N3 和 400 µL 的无水乙醇，手动震荡 2 次以混匀，按照离心步骤 10-15 操作。

注：质粒已纯化完成，接下来的步骤用以内毒素去除。

- 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 10 µL EndoClean Buffer 至 100 µL 质粒样品），溶液变得浑浊。若温度低于 23℃，溶液仍旧澄清的。
- 4. 涡旋 10 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. 12,000 rpm 离心 10 min（离心温度需高于 23℃用以分层），小心转移上层清液至另一个 2 mL 离心管。

注：离心后若没有观察到分层，加入 200 µL 氯仿，涡旋 10 s，重复步骤 5。

- 6. 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，12,000 rpm 离心 10 min，小心弃上清液。
- 7. 加入 1 mL 70%乙醇，12,000 rpm 离心 5 min。
- 8. 小心弃上清液，干燥 DNA 沉淀 30 min，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

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。小提最高使用 25 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1，B1，N3 以及 Buffer KB，这些缓冲液可单独向 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℃。请勿将菌液置于 4℃过夜。
	质粒拷贝数低	增加培养基和 Buffer A1,B1,N3 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

