

无内毒素质粒小提试剂盒II简明说明书（PD1222）

Ver: 2003

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 1-10 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、原代细胞的转染及显微注射。

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 后应储存于 4℃。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 1.5 mL 和 15 mL 离心管
- 小型台式离心机或真空负压装置

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	6 mL	30 mL	140 mL
Buffer B1	6 mL	30 mL	140 mL
Buffer N3	2 mL	10 mL	50 mL
Buffer RET	6 mL	30 mL	140 mL
Buffer KB	6 mL	30 mL	135 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	15 mL	3×24 mL
EndoFree Elution Buffer	4 mL	20 mL	60 mL
RNase A(20 mg/mL)	30 µL	150 µL	700 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 (PD1222-00)或 60 mL (PD1222-01)或 96 mL (PD1222-02)96-100%乙醇加入至每个 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。
- Buffer N3 低于 10℃可能会形成沉淀，加热至 37℃可溶解。
- 确保离心机转速可以达到 12,000 ×g，在室温下（15-25℃）进行所有离心操作。

操作步骤（离心法）

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。

注：请勿使用储存在 4℃的菌落培养皿。

注：请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

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。

2. 12,000 ×g 离心 1 min，弃上清，将管子倒置于纸巾上，去除残留培养基。

注：残留的培养基将会导致裂解不充分造成的低 DNA 得率；

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 **500 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：充分重悬对于细菌裂解和裂解液中和是至关重要的。

5. 加入 **500 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。

6. 加入 **150 µL Buffer N3**，立即反转/震荡 5 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 ×g 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，然后转移上清液至 **Mini Column**。

8. 小心转移澄清的裂解液至一个 15 mL 离心管内，加入 **500 μL** 的 **Buffer RET** 和 500 μL 的 100%乙醇，手动震荡 3 次以混匀。

9. 转移 700 μL 的上述混合液至一个 **Mini Column**，12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，转移剩余的混合液至 **Mini Column**，12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

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

注：此步骤对于 **endA**-菌株例如 **DH5α**和 **TOP10** 而言不是必要的，**Buffer KB** 对于 **endA**+菌株例如 **HB101**, **JM110**, **JM101** 及其衍生菌株是必要的。

11. 加入 **600 μL DNA Wash Buffer** (确认已加入无水乙醇)，12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。重复步骤 **11**。

12. 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**，打开柱盖，12,000 ×g 离心 2 min。

注：开盖离心可去除残留乙醇，该步骤至关重要。

13. 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 ×g 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 ×g 离心 1 min 洗脱质粒。

注：质粒 DNA 可用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染或显微注射。

14. DNA 浓度的确定，

浓度 (μg/mL) =OD₂₆₀×50×稀释倍数

注：二次洗脱有助于得到最高得率，若想要高浓度的质粒，可使用少量的 **Endofree Elution Buffer** 洗脱。

操作步骤（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 **1~7** 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。重复此步骤直至剩余的溶液全部通过。

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**-菌株例如 **DH5α**和 **TOP10** 而言不是必要的，**Buffer KB** 对于 **endA**+菌株例如 **HB101**, **JM110**, **JM101** 及其衍生菌株是必要的。

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. 打开负压装置，干燥空柱子 5 min。

7. 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 ×g 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 ×g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

注：纯化得到的质粒 DNA 可用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染或显微注射。

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**，**N3**，**RET** 和 100%乙醇，**Buffer A1**，**B1**，**N3**，**RET** 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	增加培养基和对应 Buffer 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

