

无内毒素质粒大提试剂盒简明说明书 (BW-PD1514)

Ver: 1912

产品简介

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

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。

本试剂盒适用于从 150-200 mL 大肠杆菌培养液中快速提取质粒, 提供的 Maxi Column 可结合至多 1 mg 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。

本试剂盒提供了两种内毒素去除方案, 方案 A 在质粒纯化过程中去除内毒素, 方案 B 在质粒 DNA 纯化后去除内毒素。

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。

要点

- RNase A: 20 mg/mL。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, 使用后将 Buffer A1/RNase A 置于 4°C 保存。

- DNA Wash Buffer: 使用前请将 20 mL (BW-PD1514-00) 或 96 mL (BW-PD1514-01) 或 216 mL (BW-PD1514-02) 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。
- 确保离心机转速 15,000 ×g。
- 在室温下 (15-25°C) 进行所有离心操作。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Maxi Columns	2	10	25
Collection Tubes	2	10	25
Buffer GBL	6 mL	30 mL	75 mL
Buffer A1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer B1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer N3	27 mL	130 mL	2x170 mL
DNA Wash Buffer*	5 mL	24 mL	54 mL
EndoClean Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
EndoFree Elution Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
RNase A (20 mg/mL)	110 µL	550 µL	1.35 mL
User Manual	1	1	1

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 高速离心机

- 50 mL 离心管
- 异丙醇

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 100 µL 菌液到 **150-200 mL** LB 培养基 (含适量抗生素), 37°C 震荡培养 14-16 h。

注: 培养时间不宜超过 16 h, 否则会引起菌体裂解和低得率。

注: 请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

注: 请勿使用保存在 4°C 的菌液作为初始菌液。

注: 请勿使用超过 200 mL 的菌液或者细胞量大于 550, 若菌液量超过 200 mL, 则对应 Buffer 的使用量应加大。

注: 此步骤适用于 LB 培养的大肠杆菌, 若使用富集培养基 TB 和 2xYT, 切记 OD₆₀₀ 不要超过 3.0。若使用超过说明的菌液, 请对应增大 buffer 的使用量。

2. 5,000 ×g 离心 10 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。

注: 残留培养基会造成低的细胞裂解导致得率低。

3. 柱平衡: 向吸附柱 **Maxi Column** 中加入 **2.5 mL 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 **10 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: 充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的。

5. 加入 **10 mL 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: 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。

6. 加入 **3 mL Buffer N3**, 立即手动震荡 5-10 次混匀。

注: 冰上静置 1 min 有助于提高得率。

注: 若菌液的 RNA 量较多, 可静置 10 min 使 RNA 酶充分发挥作用。

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. 转移裂解液至高速离心管, 12,000 ×g 离心 10 min。小心转移澄清上清液至 50 mL 管 (避免吸到漂浮的沉淀物)。

注: 若没有高速离心机, 可单独购买 Filter Syringe。

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 5 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: 冰上孵育期间混匀样品几次 (不要离开冰)。

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. 65°C 孵育 5 min, 溶液变得浑浊。10,000 ×g, 室温 (必须 >23°C) 离心 10 min (另一种方法是, 样品可 2,500 ×g 离心 20 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: 上层中的红色不会影响到结果。

注: 约 99% 的内毒素可通过 EndoClean Buffer 一次去除。内毒素水平在 0.1-10 EU (内毒素) /μg DNA, 若要求内毒素水平低于 0.1 EU/μg DNA, 可重复步骤 8-9。

10. 小心转移澄清的裂解液, 避免吸到有颜色层, 至一个 50 mL 离心管内。加入 **9 mL Buffer N3** 和 **10 mL** 的无水乙醇, 手动震荡以混匀。混合液应立即上 DNA 柱。

11. 转移 18 mL 的混合液至 **Maxi Column**, 8,000 ×g 离心 1 min。弃滤液, 将 **Maxi Column** 放回收集管。重复步骤 **11** 直至所有混合液通过。

注: Maxi Column 最大承受 20 mL 裂解液, 若使用 20 mL 样品, 室温静置 2-5 min (避免离心过程中洒落)。

12. 加入 **10 mL DNA Wash Buffer** 至 **Maxi Column**, 8,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。

13. 加入 **10 mL** 无水乙醇, 8,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。

14. 将柱子插入 50 mL 离心管, 打开柱盖, 10,000 ×g 离心 10 min。

注: 乙醇是否去除干净至关重要, 空离后将柱子放入 50-60°C 烘箱 10 min 可更好的去除残留乙醇。

15. 小心地将 **Maxi Column** 转移至一个干净的 50 mL **Collection Tube**, 在膜中央加入 **1.5-2 mL EndoFree Elution Buffer** (55°C 预热), 静置 1 min, 10,000 ×g 离心 5 min 洗脱质粒 DNA。

可选: 将洗脱下来的液体二次上柱洗脱。

注: 第一次洗脱可得到 70% 质粒, 二次洗脱可获得另外 20-30% 的 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。

16. DNA 浓度可通过以下方式计算,

DNA 浓度 (μg/mL) = OD_{260nm} × 50 × 稀释倍数

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 50 mL 管, 加入 **9 mL Buffer N3** 和 **10 mL** 的无水乙醇, 混匀, 按照离心步骤 **10-14** 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。

注: 加入 EndoClean Buffer 后溶液变得浑浊, 若温度低于 23°C, 溶液依旧澄清。

注: 使用干净的剪刀切开枪头前端后转移粘稠的 EndoClean Buffer。

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. 65°C 孵育 5 min, 溶液又变得浑浊。12,000 ×g 离心 10 min (离心温度需高于 23°C 用以分层)。若低于 23°C, 将不会见到分层。

6. 小心转移上层清液至一个 2 mL 离心管内。加入 **0.1 倍体积** 的 3 M KAc (pH 5.2) 和 **0.7 倍体积** 的异丙醇沉淀质粒 DNA, 12,000 ×g 离心 10 min, 小心弃上清液。

7. 加入 **1 mL** 70% 乙醇, 12,000 ×g 离心 5 min。小心弃上清液, 干燥 DNA 沉淀 30 min。

8. 用 **EndoFree Elution Buffer** 重悬 DNA。

注: 第一次洗脱可得到 70% 质粒, 二次洗脱可获得另外 20-30% 的 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。最高使用 400 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, N3 以及 100% 乙醇, Buffer

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA（中国）

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com



- 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。