

无内毒素质粒中提过滤法试剂盒I简明说明书（PD1416）

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。核酸最终通过无菌水或者 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。

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 15-50 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 250 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℃）。加入 RNase A 后的 Buffer A1 后应储存于 4℃。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Midi Columns	2	10	25
Filter Syringe (20 mL)	2	10	25
Buffer GBL	3 mL	12 mL	30 mL
Buffer A1	6 mL	30 mL	70 mL
Buffer B1	6 mL	30 mL	70 mL
Buffer N3	8 mL	40 mL	100 mL
EndoClean Buffer	2 mL	10 mL	25 mL
DNA Wash Buffer*	5 mL	24 mL	54 mL
RNase A (20 mg/mL)	30 µL	150 µL	350 µL
Endofree Elution Buffer	3 mL	15 mL	50 mL
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 20 mL (PD1416-00) 或 96 mL (PD1416-01) 或 216 mL (PD1416-02) 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。
- **Buffer N3** 低于 10℃ 可能形成沉淀，使用前请于 37℃ 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℃）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 **15-50 mL** LB 培养基（含适量抗生素），37℃ 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℃，震荡（约 250 rpm）培养 6-8 h。

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：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 **1mL Buffer GBL**，10,000 xg 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 **2.5 mL Buffer A1** (使用前加入 **RNase A**)，用移液器或涡旋振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 **2.5 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 **600 µL 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，14,000 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 (没有提供)，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. 13,000 x g，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，2,500 x g 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 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 15 mL 管内。加入 **3 mL Buffer N3** 和 3 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**)，>2,500 x g 离心 1 min。弃滤液，将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**。重复步骤 **11** 直至所有混合液通过。

12. 加入 **5 mL DNA Wash Buffer**，>2,500 x g 离心 1 min，弃滤液，将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**，重复步骤 **12**。

13. 打开柱盖，10000rpm 离心 2 min。该步骤可去除残留乙醇，以便获得最佳洗脱。65°C孵育 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。

14. 将 **Midi Column** 转移至一个干净的 15 mL 离心管，在膜中央加入 **0.3-0.5 mL Endofree Elution Buffer**，静置 1 min，>5,000 x g 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内毒素敏感细胞系、

原代细胞的转染及显微注射。

15. DNA 浓度可通过以下计算，

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

B. 质粒提取后去除内毒素

1. 按照离心步骤 **1~7** 进行操作。

2. 小心转移上清液至 15 mL 管，加入 **3 mL Buffer N3** 和 3 mL 的无水乙醇，混匀，按照步骤 **11-14** 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。

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. 12,000 x g 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 µL 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，12,000 x g 离心 10 min，小心弃上清液。

8. 加入 1 mL 70%乙醇，12,000 x g 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。

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

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 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℃。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 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

