

A 型高纯度无内毒素质粒提取试剂盒

HighPurity Endofree Plasmid Extraction Kit (Maxi)

BH32002

使 用 说 明 书

Version 1.00



目录

01/产品概述.....	1
02/产品组分.....	1
03/保存条件.....	1
04/适用范围.....	1
05/自备材料.....	2
06/注意事项.....	2
07/实验流程图.....	2
08/实验流程.....	3
09/常见问题与解决方案.....	4

01/产品概述

A 型高纯度无内毒素质粒提取试剂盒利用氯化钙沉淀、离子交换、疏水作用等方法使内毒素、RNA、宿主蛋白等杂质均可以彻底的去除。一次可处理 LB 摇瓶过夜培养菌液 100-300mL，采用碱裂解法裂解细菌，可以制备毫克级质粒产品（浓度大于 300ng/μL），提取过程无需大容量高速离心步骤，采用独特的吸附柱去除质粒中 RNA、宿主蛋白、宿主 DNA 等杂质，并且上述杂质残留量均低于市售质粒提取试剂盒相关标准，其中内毒素残留小于 10EU/mg，远低于商品化的无内毒素质粒提取试剂盒相关标准（低于 100EU/mg），每个吸附柱可吸附高达 2mg 的质粒 DNA。纯化后的质粒 DNA 可直接用于酶切、测序、连接、转化、转染等常规生物学实验。本方法提取质粒耗时短，内毒素含量低，避免使用高速大容量台式离心机带来的安全风险。

02/产品组分

组分	10rxns
RNaseA	1mL
Buffer S1	120mL
Buffer S2	120mL
Buffer S3	120mL
CaCl ₂	120mL
Buffer A1	200mL
Buffer A2	100mL
Buffer A3	30mL
过滤器	10个
层析柱1	10个
层析柱2	10个
硅胶管（含接头）	2根

RNase A：酶解样品中的 RNA；

Buffer S1：细菌悬浮液

Buffer S2：细菌裂解液

Buffer S3：中和液

Buffer PW1：去除质粒中的蛋白等杂质

Buffer PW2：去除质粒中的盐离子残留

Elution Buffer：洗脱液

Spin Columns：质粒 DNA 吸附离心柱

Collection Tubes 2 ml：滤液收集管

03/保存条件

Buffer S3、CaCl₂ 溶液 0~8℃保存，室温运输；其他组分 15~25℃保存，室温运输。

04/适用范围

本产品适用于 100-300mL 过夜培养的菌液的质粒提取。

05/自备材料

1. 无水乙醇、1.5mL、2mL 灭菌离心管，50mL 离心管，异丙醇。

06/注意事项

1. 质粒提取得率和质量与宿主、质粒拷贝数，质粒的稳定性等因素有关。
2. 小于 3Kbp 的质粒此方法不适用。
3. 柱 1 与柱 2 安装顺序不能装反。
4. 注意不要直接接触 Buffer S2、Buffer S3、Buffer A1，使用时应戴手套，使用后应立即盖紧盖子。
5. 层析柱操作：提取质粒过程中应避免气体进入层析柱内。

07/实验流程图

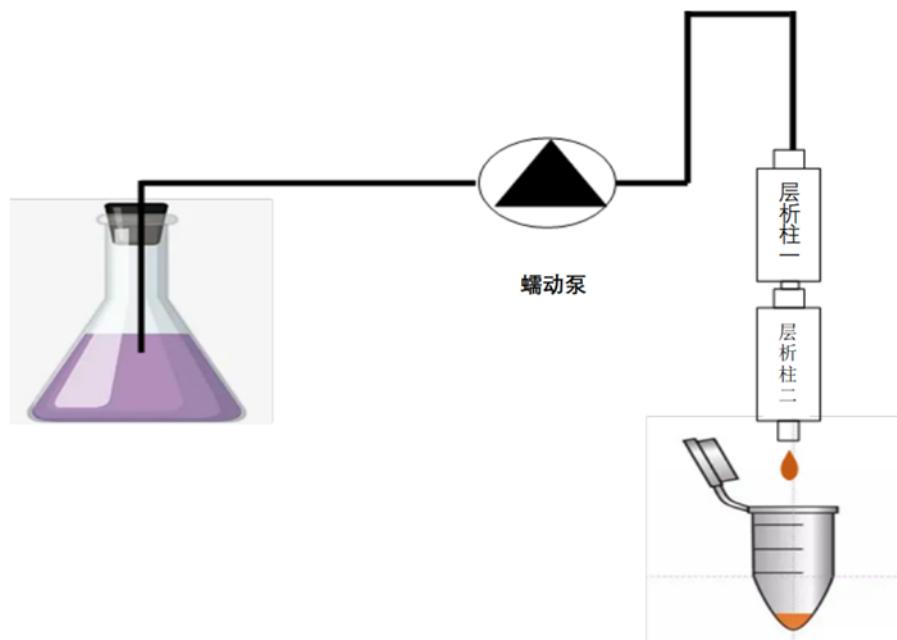


图1 层析柱及层析系统组装示意图。

08/实验流程

- 层析柱组装：**将层析柱按照本说明书实验原理章节中图 1 所示方式串联。
 - ◆ 打开层析柱两端堵头时若发现有气体进入柱内需将 ddH₂O 沿柱子内壁注入赶出气泡。
- 预处理层析柱：**用 10mL 注射器缓慢推注 10mL Buffer A1 流经两个层析柱，弃去废液。
- 弃培养基：**取 100 ~ 300mL (菌泥湿重约 1g) 过夜培养 (12 ~ 16h) 的菌液，分装到离心管中 (自备)，4000rpm 离心 10min。弃培养基，倒置离心管使培养基尽量弃掉，称量菌泥重量。
 - ◆ 适用于发酵罐中高密度培养的菌液。
- 重悬：**向离心沉淀的菌泥中加入 Buffer S1 溶液 (每克菌泥加入 10mL S1 溶液)，使用移液器将菌泥吹打混合均匀。
- 裂解：**加入与 S1 溶液同等体积的 Buffer S2 溶液，温和地上下颠倒混匀 4 ~ 8 次，使菌悬液裂解充分，室温静置 2 ~ 5 min。
 - ◆ 剧烈混匀会引起基因组 DNA 断裂，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段，降低质粒纯度。此时溶液变得粘稠而透亮，表明细菌已充分裂解。所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏。若溶液未变清亮，可能由于菌体过多导致裂解不彻底，应适当减少菌体量。
- 中和：**加入与 S1 溶液同等体积的 Buffer S3 溶液，立即温和地上下颠倒混匀 4~8 次，此时出现白色絮状物。
 - ◆ 此操作应立即混匀，防止仅局部产生沉淀影响中和效果。
- 过滤：**将沉淀后的菌液缓慢倒入过滤器中，轻轻推注过滤裂解液。
- 沉淀：**加入与 S1 溶液同等体积的 2M CaCl₂ 溶液，在 2~8℃ 沉淀裂解液 30~60min，将沉淀后的菌裂解液 3000rpm 离心 5min，收集上清。
 - ◆ 若想最终质粒中 RNA 和内毒素含量低，可适当延长沉淀时间。
- 稀释：**使用 ddH₂O 将 8 所得裂解液离心上清稀释 4 倍 (即加入 3 倍体积的 ddH₂O)。
- 组装：**将蠕动泵、层析柱、硅胶管按图 1 所示连接组装。
- 上样：**组装完毕后将硅胶管接到澄清的裂解液后，以 1~2mL/min 流速上样，样品全部上至柱子上后将柱子两端硅胶管拆下，保留层析柱 2，用 10mL 注射器缓慢推注 10mL Buffer A2 溶液流经层析柱 2，弃废液。
 - ◆ 上样流速不宜过快，过快会导致质粒 DNA 与层析柱结合不彻底。注射器推注时，减缓推注速度可以提高 RNA 去除率。
- 洗脱：**用 2mL 注射器缓慢推注 2 mL Buffer A3 流经层析柱 2，使用新的无内毒素离心管 (自备) 收集洗脱液。

- ◆ 若下游实验无需除盐则在此步骤结束实验，注射器推注时，减缓推注速度可以提高洗脱效率。

13. **沉淀：(可选)** 向 EP 管中加入 2~3 倍体积预冷的无水乙醇 (自备)，充分混匀后在-20℃静置 15~30min 后 12000rpm 离心 10min(离心温度 2~8℃) 用 500μL 预冷的 70%乙醇润洗 2 次。
14. **溶解：(可选)** 弃去上清将离心管盖打开 55℃金属浴 5min 将乙醇挥发，随后加入 300~1000μL 无内毒素的纯水或者其它无内毒素低盐缓冲液，多次吹打并溶解沉淀。

09/常见问题与解决方案

◆ 低拷贝质粒或大质粒 (>10 kb) 提取

若所提质粒为低拷贝数质粒或是大于 10 kb 的质粒，应加大菌体使用量，使用 5~10 ml 过夜培养的菌液，同时按照比例增加 Buffer S1、Buffer S2、Buffer N3 的用量，洗脱缓冲液 Elution Buffer 应在 55℃水浴锅预热，同时在吸附和洗脱时可以适当的延长时间，可以增加得率。其它步骤一致。

◆ DNA 产量低

质粒拷贝数：载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体每毫升培养过夜的菌液，高拷贝数的质粒载体产量为 3~16 μg。长片段质粒和表达型载体常以中低拷贝数为主，每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μg。

- 低拷贝质粒：pBR322, pSC101 及其衍生载体, pACYC 及其衍生载体, SuperCos, pWE15。
- 高拷贝质粒：pBS, pTZ, pGM-T, pUC。

菌种问题：菌种保存过程中会有质粒丢失现象，培养细菌前最好先涂板(或划线)活化，以稳定产量。

细菌未充分裂解：细菌须在 Buffer S1/RNase A 中充分重悬，成团成块的细菌因无法裂解会降低产量。

试剂准备有误：Buffer S2 若有沉淀析出需加热溶解后使用。Buffer PW2 加入乙醇体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。Buffer S1 中未添加 RNase A。

长片段质粒 DNA：长片段质粒常以中低拷贝数为主，可提升菌液用量至 10 ml 以提高产量。将 Elution Buffer 预热至 55℃，并重复二次洗脱。

培养时间：菌液培养时间需控制在 12~16 h，时间过短菌量较少，培养时间过长会因营养匮乏等不利因素造成质粒丢失。

菌株/菌株老化：筛选适宜的菌株。控制传代次数。

裂解问题：加入 Buffer S2 时，必须轻柔颠倒混匀；处理多个样品时，加入 Buffer S2 时算起，总时间不要超过 5 min。

◆ 下游实验结果不理想

盐污染: 确保用 Buffer PW2 洗涤两次。

乙醇污染: 在最后一次 Buffer PW2 洗涤后可将吸附柱离心时间由原来 1 min 增加至 2 min。

质粒降解: 用 endA+ 的菌株如 HB101 或其它野生型菌株, 含有高丰度的核酸酶, 必须使用

Buffer PW1 去除蛋白杂质。



武汉滨会生物科技股份有限公司
Binhui Biopharmaceutical Co., Ltd.
<http://www.binhui-bio.com>
Tel: 027-87326962
Sales: binhui@binhui-bio.com
Support: binhui@binhui-bio.com
Service: binhui@binhui-bio.com



扫码了解更多