

无内毒素质粒中量制备试剂盒

(离心柱型离心法)

BK2008: 10次 / 50 次

试剂盒组成

Components	BK2008-10	BK2008-50
吸附柱 GP4+收集管 (GenClean Column GP4)	10 个	50 个
5mL 收集管 (5-mL Collection Tube)	10 个	50 个
平衡液 CBS (Buffer CBS)*	5 mL	25 mL
溶液 SI (Solution I)	12 mL	60 mL
溶液 SII (Solution II)	12 mL	60 mL
溶液 SIV (Solution IV)	10 mL	50 mL
溶液 ePB (Solution ePB)	12 mL	60 mL
溶液 eW1 (Solution eW1)	6 mL	30 mL
漂洗液 WS(浓缩) (Wash Solution(conc.))*	3 mL	12 mL
洗脱缓冲液 EB (Elution Buffer)	5 mL	15 mL
RNase A (10mg/mL)	200 μ L	1 mL

注意事项:

*平衡液CBS: 用于活化吸附柱硅胶膜, 提升质粒结合效率。

*漂洗液WS: 使用前加入4倍WS体积无水乙醇(或95%乙醇)。

产品特点简介:

- 本试剂盒提供了一个在台式高速离心机上, 使用 2mL 小离心管, 提取 100~200 μ g 质粒的方案。
- 本试剂盒是 BK2009 的小离心柱版本, 原理相同。mg 级质粒提取, 可选择 BK2009 (无内毒素质粒大量制备试剂盒)。
- 高效吸附: 硅胶膜吸附柱容量 100-200 μ g, 视质粒拷贝数及大小有较大差别。
- 高纯度低内毒素: 提取质粒内毒素水平 <1 EU/ μ g (以中高拷贝质粒为例), 显著优于常规方法 (>1000 EU/ μ g)。
- 如果需要处理更多的菌液, 及内毒素含量更低的质粒, 请选择 BK2108 (增强型无内毒素质粒中量制备试剂盒)。
- 快速流程: 结合碱裂解与膜吸附技术, 操作全程小于 1 小时。
- 灵活兼容: 可以灵活使用不同的菌液量提取质粒, 合并吸附到一根 GP4 柱中, 最多可提取 200 μ g 质粒。

保存与运输:

- RNase A: 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 可常温运输 (半年以上长期存放建议放 -20 $^{\circ}$ C)。初次使用本试剂盒时, 请将 RNase A 全部加入 Solution I 中, 均匀混合后, 4 $^{\circ}$ C 保存。
- 其它组分: 室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 稳定保存 18 个月; 高温环境或长期保存, 建议 2-8 $^{\circ}$ C 保存。
- 运输条件: 常温运输, 高温季节建议添加冰袋。

实验前准备:

- 首次使用前, 请仔细阅读说明书。
- 检查漂洗液 WS 是否已添加 4 倍体积无水乙醇(或 95%乙醇)。
- 室温较低时, 若溶液 SII 出现沉淀, 37 $^{\circ}$ C 加热溶解后冷却至室温使用。
- 使用新鲜过夜培养的菌液 (推荐 2YT 培养基)。

快速操作指南(Quick Guide)

➤ DNA 吸附柱平衡处理

1. 向 GP4 柱加 400 μ L 平衡液 CBS, 静置 2 分钟, 6000 \times g 离心 2 分钟, 弃废液, 待用。

➤ 菌体收集、裂解与澄清

2. 菌体收集: 每份样品收集 2 管菌液, 通过多次离心收集所需要的菌体量。
每管收集菌液体积建议 (LB 培养基 6-8 mL; 2YT 培养基 4-6 mL), 8000rpm 离心 1 分钟, 弃上清。
3. 重悬菌体: 每管加入 500 μ L 溶液 SI, 振荡至无可见菌块。
4. 裂解处理: 每管加入 500 μ L 溶液 SII, 轻柔翻转混匀 4~10 次, 形成透明裂解液 (裂解时间 \leq 5 分钟)。
5. 中和并澄清沉淀: 每管加入 400 μ L 溶液 SIV, 翻转混匀 8~10 次, 室温静置 10 分钟, 12000rpm 离心 5 分钟。
6. 上清液调节: 合并步骤 5 中的两管上清液到一支新的 5mL 收集管中 (试剂盒中提供), 估计可得到 2.5~2.7mL 的上清, 然后加入 1.1mL 溶液 ePB 并颠倒混匀备用。
注: 如果上清液体积与 2.5~2.7mL 相差较多, 按照实际上清液体积 40%加溶液 ePB。

➤ 质粒纯化

7. 吸附柱吸附质粒: 步骤 6 所得混合液, 通过多次离心, 将样品吸附到 GP4 柱中。混合液用量 \leq 800 μ L/次, 12000rpm 离心 1 分钟。
8. 漂洗: 依次加入 500 μ L 溶液 eW1、500 μ L 漂洗液 WS (两次), 每次 12000rpm 离心 1 分钟。
9. 干燥: 12000rpm 离心 3 分钟, 将 GP4 柱放入新的 1.5mL 离心管中, 打开管盖, 并室温放置 5 分钟彻底去除乙醇。

➤ 质粒洗脱

10. 加入 100 μ L 洗脱缓冲液 EB, 盖好 GP4 柱管盖, 室温静置 5 分钟, 12000rpm 离心 2 分钟收集洗脱液。
11. 二次洗脱: 如果预期质粒总量超过 100 μ g, 可以按照步骤 10, 用 80 μ L 洗脱缓冲液 EB 做第二次洗脱, 测定其质粒浓度, 决定是否与第一次洗脱液合并使用。

➤ 质量检测

电泳检测: 测量浓度, 并取 1-3 μ L 样品进行琼脂糖凝胶电泳 (建议稀释后检测, DNA 总量不超过 500ng)

保存建议: -20 $^{\circ}$ C 长期保存, 避免反复冻融。

质粒提取注意事项：

1. 吸附柱 GP4 处理注意事项

- GP4 柱预处理：使用前需经柱平衡液处理，可显著提升质粒吸附效率和柱体可靠性。
- 操作时机：建议在菌液裂解时同步处理 GP4 柱。

2. 关于 BK2008 和 BK2108 选择

- 预期质粒得率：BK2108 要多于 BK2008 1~2 倍。
- 处理菌液量：BK2108 建议使用 2~3 倍于 BK2008 菌量，通常 BK2108 使用 50mL 离心管处理 15~30mL 菌液。
- 内毒素处理方式：BK2108 做深度内毒素处理，额外耗时约 20~30 分钟。
- 上清液过柱方式：BK2008 以离心法为主，BK2108 以负压抽滤法为主。

3. 菌液培养条件、菌液用量相关

培养基选择：

- 小量质粒提取：可以使用 LB 培养基或 2YT 培养基。
- 中/大量质粒提取：优先选用 2YT 培养基。

培养条件：

- 采用小体积培养基+高转速培养确保溶氧量。
- 控制摇菌时长：摇菌时间过长，菌体中质粒会有大量丢失。
- 建议预实验：取 2mL 菌液小提验证质粒质量及产量。

质粒提取时菌液用量建议：

- LB 培养基 6~10 mL；2YT 培养基 4~6 mL。
- 使用过多的菌液，会导致质粒产量降低，质量下降。

菌液短期保存：-20℃速冻后转 4℃保存（有效期 2 天）。

4. 菌体裂解注意事项：

- 加入溶液 SII 后，可翻转摇匀至澄清透明状，否则菌液过量。
- 加入溶液 SIV 后，要充分混匀，必要时，较用力摇匀。否则后面离心澄清上清时，沉淀不结实，或者成粘团状，上清不易从沉淀中分离出来。

5. 关于裂解指示剂的使用

- 加入裂解指示剂，可以观察菌液裂解及中和时，溶液是否混合充分。如果未能充分混合，则裂解液颜色不均匀。
- 添加裂解指示剂，不会对提取的质粒质量产生影响。
- 如果需要裂解指示剂，可以单独购买。

质粒提取常见问题分析：

1. 质粒产量偏低，浓度过低

原因分析：

- 菌体量不足：培养时间短、接种量不足或菌种质量欠佳。
- 质粒拷贝数低：质粒本身拷贝数低或宿主菌不适合。
- 裂解不充分：裂解时间短或裂解液用量不足。
- 质粒丢失：操作过程中发生错误或溶液使用错误。
- 洗脱不充分：洗脱液体积不足或加洗脱后放置时间短。

解决办法：

- 增加菌体量：延长培养时间或增加接种量。
- 选择高拷贝质粒或适合的宿主菌，使用新转化的菌种。
- 优化裂解条件：延长裂解时间或调整裂解液用量。
- 避免剧烈操作，防止质粒降解。
- 增加洗脱液体积或加入洗脱液后延长放置时间到 10 分钟。

2. 菌体裂解后过于粘稠，不易离心

原因分析：

- 菌体使用过量：使用了过多的菌液，或菌液放置时间过长。
- 裂解操作不到位：加入溶液 SIV 后未充分混匀。

解决办法：

- 减少菌体量：使用合适的菌液量提取质粒。
- 按照前面质粒提取注意事项第 3 第 4 条，合理操作。

3. 质粒提取后电泳条带异常，出现多条带，出现 RNA 干扰带

原因分析：

- 质粒构型多样：超螺旋、线性、开环质粒共存。
- 质粒二聚体或多聚体：质粒在提取过程中形成多聚体。
- 宿主基因组 DNA 污染：裂解过度或操作幅度过大。
- 有 RNA 残留：溶液 SI 放置过久，RNA 酶活性降低。

解决办法：

- 分析质粒构型：必要时将质粒酶切后再电泳检测。
- 优化菌体生长条件及提取条件，减少质粒多聚体形成。
- 控制裂解条件：使用合适的菌液量，轻柔操作，避免基因组 DNA 对质粒提取的影响。
- 合理使用 RNA 酶：大提质粒时，一般不将 RNase A 加入到溶液 SI 中，而是在加入溶液 SIV 步骤后面，直接加 RNase A，可以显著提高 RNA 酶活性，减少 RNA 对质粒提取的影响。小提质粒时，为实验方便，可以直接将 RNase A 加入到溶液 SI 中，并放 4℃保存。如果加入 RNase A 后放置时间较长，需再额外补加 RNase A。