

## 无内毒素质粒大量制备试剂盒

## 快速操作指南(Quick Guide)

(离心柱型离心法)

BK2009: 2次 / 10 次

### 试剂盒组成

Components	BK2009-2	BK2009-10
吸附柱 GP6+收集管 (GenClean Column GP6)	2 个	10 个
50mL 收集管 (50-mL Collection Tube)	2 个	10 个
推杆过滤器 (Push Filter)	2 个	10 个
平衡液 CBS (Buffer CBS)*	10 mL	50 mL
溶液 SI (Solution I)	25 mL	120 mL
溶液 SII (Solution II)	25 mL	120 mL
溶液 SIV (Solution IV)	20 mL	100 mL
溶液 ePB (Solution ePB)	25 mL	120 mL
溶液 eW1 (Solution eW1)	20 mL	100 mL
漂洗液 WS (浓缩) (Wash Solution)*	12 mL	2×24 mL
洗脱缓冲液 EB (Elution Buffer)	10 mL	30 mL
Visual Blue	200 $\mu$ L	600 $\mu$ L
RNase A (10mg/mL)	250 $\mu$ L	1200 $\mu$ L

### 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)。

### 工业大包装规格, 请单独询价。

### 产品特点简介:

- **高效吸附:** 硅胶膜吸附柱容量 1000-4000 $\mu$ 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/ $\mu$ g (以中高拷贝质粒为例), 显著优于常规方法 (>1000 EU/ $\mu$ g)。
- **快速流程:** 结合碱裂解与膜吸附技术, 操作全程约 2~3 小时。
- **灵活兼容:** 可以兼具角转子的高速离心和水平转子的高通量。

### 保存与运输:

- **RNase A:** 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 可常温运输 (半年以上长期存放需 -20 $^{\circ}$ C)。  
大提质粒时, 通常将 RNase A 的添加步骤调整至溶液 SIV 加入之后即时添加, 可显著提升 RNA 的降解效率, 减少后续 RNA 残留对质粒提取的影响。
- **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, 请仔细完整阅读说明书。
- 检查漂洗液 WS 是否按 1:4 比例添加乙醇。
- 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)。

**注: 以下操作以角转子离心为基准。使用水平转子离心, 参数见括号内标注。**

### ➤ 菌体收集、裂解与澄清

- 菌体收集:** 通过多次离心收集所需要的菌体量。  
取 50-200 mL 菌液 (LB 培养基 100-200 mL; 2YT 培养基 50-100 mL), **6000 $\times$ g 离心 3 分钟 (水平转子: 4000rpm, 10 分钟)**, 弃上清。
- 重悬菌体:** 加入 **10 mL 溶液 SI**, 振荡至无可见菌块。  
**(选做)** 可在此步加入 50 $\mu$ L Visual Blue, 用于指示菌液裂解。
- 裂解处理:** 加入 **10 mL 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)。
- 中和并澄清沉淀:** 加入 **8 mL 溶液 SIV**, 100  $\mu$ L RNase A, 翻转混匀 8-10 次, 室温静置 10 分钟, **10000 $\times$ g 离心 5 分钟 (水平转子: 4000rpm, 5 分钟)**。
- 使用推杆过滤器将上清液过滤至 50 mL 尖底离心管 (可得约 25-27 mL 上清), 根据实际体积, 准确加入上清液体积 **40%** 比例的溶液 ePB, (如 25mL 上清液加 10mL ePB) 混匀备用。

### ➤ 质粒纯化

- 吸附柱平衡:** (建议在处理上清液期间处理) 向 GP6 柱加 **4 mL 平衡液 CBS**, 静置 2 分钟, 6000 $\times$ g 离心 2 分钟, 弃废液。
- 吸附柱吸附质粒:** 步骤 5 所得混合液, 通过多次离心, 将样品吸附到 GP6 柱中。混合液用量  $\leq$  9 mL/次, 6000 $\times$ g 离心 2 分钟。**(水平转子:  $\leq$ 15mL/次, 4000rpm, 离心 1 分钟)**。
- 漂洗:** 依次加入 **8 mL 溶液 eW1**、**8 mL 漂洗液 WS (两次)**, 每次 **6000 $\times$ g 离心 2 分钟 (水平转子: 4000rpm, 1 分钟)**。
- 干燥:** **10000 $\times$ g 空离 5 分钟**, 并室温放 5 分钟彻底去除乙醇。**(水平转子: 4000rpm, 5 分钟, 50 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟)**

### ➤ 质粒洗脱

- 加入 **1.2 mL 洗脱缓冲液 EB**, 室温静置 5 分钟, **10000 $\times$ g 离心 3 分钟**收集洗脱液。  
**(使用水平转子: 加 1.5 mL EB, 室温放置 5~10 分钟, 4000rpm, 5 分钟。并将洗脱液加到膜上, 重复洗脱一次以提高洗脱效率)**
- 二次洗脱:** 根据实验需要, 可按步骤 13 做第二次洗脱, 并独立收集洗脱液, 备用。一般二次洗脱可回收的质粒质量参考:  
角转子高速离心回收: 20%~30%。  
水平转子低速离心回收: 20%~50%。

### ➤ 质量检测

**电泳检测:** 测量浓度, 并取 1-3  $\mu$ 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 GP6 处理注意事项：

- GP6 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：建议与上清液做内毒素清除步骤同步进行。

### 2. 关于离心相关注意事项

- 角转子：离心效果好，尤其是洗脱环节，但是通量较低。
- 水平转子：通量大，但需延长离心时间补偿离心力不足。
- 如果处理的样品数量较大，建议角转子离心机与水平转子离心机搭配使用，以发挥各自优势。
- **如果条件允许，一般建议在漂洗后甩干，及加入洗脱液后离心这两步，尽可能使用高速离心，以节约甩干后干燥时间，以及大幅度提高洗脱效率。**

### 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。
- 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 100-200 mL； 2YT 培养基 50-100 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，因此建议在操作过程中添加。
- 添加裂解指示剂，不会对提取的质粒质量产生影响。

## 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浓度不足。
- 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：洗脱液体积不足或洗脱时间短。

#### 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。
- 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。