

无内毒素质粒小提中量制备试剂盒

(增强离心柱型)

BK2104: 25次 / 100 次

试剂盒组成

Components	BK2104-25	BK2104-100
吸附柱 GP3+收集管 (GenClean Column GP3)	25 个	100 个
平衡液 CBS (Buffer CBS)*	10 mL	25 mL
溶液 SI (Solution I)	15 mL	60 mL
溶液 SII (Solution II)	15 mL	60 mL
溶液 SIV (Solution IV)	12 mL	50 mL
溶液 GETR (Solution GETR)	3 mL	12 mL
溶液 ePB (Solution ePB)	13 mL	50 mL
溶液 eW1 (Solution eW1)	15 mL	60 mL
漂洗液 WS(浓缩) (Wash Solution(conc.))*	6 mL	24 mL
洗脱缓冲液 eEB (Enhanced Elution Buffer)	10 mL	25 mL
RNase A (10 mg/mL)	250 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: 使用前按 1:4体积比加入无水乙醇(或95%乙醇)。
- 工业大包装规格, 请单独询价。

产品特点简介:

- 本试剂盒采用优化的溶液配方, 和独特的核酸吸附膜, 可以使用台式高速离心机, 通过简单的操作, 获取低内毒素或者超低内毒素含量的高浓度的质粒, 非常适合于小量提取几十到上百微克低内毒素质粒, 用于转染等实验。
- **高效吸附:** 硅胶膜吸附柱容量可达 **100 μ g**, 洗脱体积可以低至 50 μ L, 易获得高浓度低内毒素含量的质粒。
- **高纯度、高浓度、低内毒素:**
快速内毒素清除方案, 所提质粒内毒素水平在 1EU/ μ g 级别。
深度内毒素清除方案, 所提质粒内毒素水平 <0.05 EU/ μ g (以中高拷贝质粒为例), 显著优于常规方法 (>1000 EU/ μ g)。
- **快速流程:** 结合碱裂解与膜吸附技术, 操作全程约 1 小时。

保存与运输:

- **RNase A:** 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 常温运输 (长期存放需 -20 $^{\circ}$ C)。初次使用本试剂盒时, 请将 RNase A 全部加入溶液 SI 中, 均匀混合后, 4 $^{\circ}$ C 保存。超过 3 个月, 需要适当补加 RNase A。
- **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。
- 确认溶液 SI 中已经加入 RNase A, 并做好标记。
- 检查漂洗液 WS 是否按比例添加入乙醇。
- 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)

注: 以下操作使用 1.5mL/2mL 离心管及台式高速离心机。

➤ DNA 吸附柱平衡处理

1. 向 GP3 柱加 200 μ L 平衡液 CBS, 静置 2 分钟, 12000 \times g 离心 1 分钟, 弃废液, 待用。

➤ 菌体收集、裂解与澄清

2. **菌体收集:** 根据菌液生长状态, 通过多次离心收集所需要的菌体量。离心条件: **8000rpm 离心 1 分钟**, 弃上清。LB 培养基收集 4-8 mL; 2YT 培养基收集 2-4 mL。
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, **12000 \times g 离心 5 分钟**。

➤ 内毒素清除

- 6A: **快速内毒素清除方案:** 直接吸取 1.1mL 上清到一新的 2mL 离心管, 准确加入 440 μ L 溶液 ePB, 混匀, 转到步骤 7。

6B: 深度内毒素清除方案:

转移步骤 5 所得上清到一新的 1.5mL 离心管中, 加入 80 μ L 溶液 GETR, 颠倒混匀, 然后转移到 42 $^{\circ}$ C 水浴中放置 1-2 分钟, 溶液将变浑浊。
室温 12000 \times g 离心 3 分钟, 溶液将分层。离心后, 静置约 2-5 分钟, 直到蓝色有机相都沉于管底。
 小心吸取 1.1mL 上清到新的 2mL 离心管, 准确加入 440 μ L 溶液 ePB, 混匀, 转到步骤。

➤ 质粒纯化

7. **离心过柱:** 分两次将上一步所得的混合液转移到 GP3 柱中, 每次不要超过 800 μ L, 每次 **12000 \times g 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 **12000 \times g 离心 1 分钟**。
9. **干燥:** **12000 \times g 离心 3 分钟**, 并室温放 5 分钟彻底去除乙醇。

➤ 质粒洗脱

10. 根据预估质粒量, 加入 **50-100 μ L 洗脱缓冲液 eEB**, 室温静置 5 分钟, **12000 \times g 离心 2 分钟**收集洗脱液。最小洗脱体积不要低于 50 μ L。

➤ 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 GP3 处理注意事项：

- GP3 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. 菌液培养条件及用量相关：

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 4-8 mL；2YT 培养基 2-4 mL。如果想使用更多的菌液，则需要将菌液分 2 管进行处理，所得上清液多次离心到一根 GP3 柱中，以便获得更多量的质粒。
- 勿使用过量的菌液。菌液过多，裂解不充分，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）。

3. 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。

4. 深度内毒素清除环节注意事项：

处理流程：

- 上清液加入内毒素清除剂 GETR 后，一般无需冷却，直接进行加热处理分相即可。如果想去除内毒素更彻底些，在加入溶液 GETR 后，可以做一步冰水浴处理。
- 离心分相后，需要静置 5~10 分钟，使大部分有机相液滴沉于离心管底部，便于后面操作。

上清水相转移方式：

- 5~10mL 以下的较小体积，建议直接用移液器吸取。
- 10mL 以上的较大体积，直接倾倒(注意不要倒出下层液体)。

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。
- 增加洗脱液体积或延长洗脱时间。

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 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：溶液 SI 加入 RNA 酶后，如果放置时间较长，需补加 RNA 酶；或者在质粒提取时，在加入溶液 SIV 步骤后面，直接补加 10μL RNA 酶，以增加 RNA 酶活性。