

## 增强型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)

BK2109: 2次 / 10 次

### 试剂盒组成

Components	BK2109-2	BK2109-10
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 GETR (Solution GETR)	8 mL	40 mL
溶液 eDBS (Solution eDBS)	40 mL	2x100 mL
漂洗液 WS(浓缩) (Wash Solution)*	12 mL	2x24 mL
无内毒素洗脱缓冲液 eEB (Enhanced 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: 使用前按 1:4比例 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:

- 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 <0.05 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°C保存, 常温运输 (长期存放需-20°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°C) 稳定保存 18 个月; 高温环境或长期保存, 建议 2-8°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, 请仔细阅读阅读说明书。
- 检查漂洗液 WS 是否按 1:4 比例添加入乙醇。
- 室温较低时, 若溶液 SII 出现沉淀, 37°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

1. 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。
2. 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 50ul Visual Blue, 用于指示菌液裂解。
3. 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 ( $\leq$ 5 分钟)。
4. 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)**。

### ➤ 内毒素清除

5. 使用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), 加入 **3 mL 溶液 GETR**, 翻转混匀。
6. **可选步骤**: 冰水浴 3-5 分钟 (能适当提高内毒素清除率)。
7. 42°C水浴 3-5 分钟至溶液浑浊, 离心分层 (**室温 10000 $\times$ g, 5 分钟 (水平转子: 4000rpm, 5 分钟)**)。然后静置 5~10 分钟, 使分层清晰。
8. 小心将上清倾倒入新的 50 mL 离心管, 可得约 20ml 溶液。根据实际体积, 准确加入 **40%比例的溶液 eDBS**, 混匀备用。

### ➤ 质粒纯化

9. 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。
10. 吸附柱吸附质粒: 步骤 8 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, 1 分钟)**。
11. 漂洗: 依次加入 **8 mL 溶液 eDBS**、**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)**。
12. 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°C放置 10 分钟)**

### ➤ 质粒洗脱

13. 加入 **1.2 mL 洗脱缓冲液 eEB**, 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 eEB, 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)**
14. 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°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 20-40 mL；2YT 培养基 15-20 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. 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，一般直接进行加热处理分相即可。如果为了更彻底的去除了内毒素，在加入 GETR 溶液后，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（注意不要倒出下层相）。

### 6. 关于质粒洗脱

- 除非预期质粒产量低于 1mg，一般值得再做一次质粒洗脱，并单独收集，视第二次洗脱浓度决定后续使用。
- 质粒洗脱时，使用尽可能大的离心力以提高洗脱效率。

## 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：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 的大量残留对质粒提取的影响。