

无内毒素质粒大量制备试剂盒

(增强离心柱型)

BK2110 2次/10次

试剂盒组成

Components	BK2110-2	BK2110-10
吸附柱 GP7+收集管 (GenClean Column GP7)	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)	25mL	130 mL
溶液 SII (Solution II)	25 mL	130 mL
溶液 SIV (Solution IV)	20 mL	105 mL
溶液 GETR (Solution GETR)	8 mL	40 mL
溶液 eDBS (Solution eDBS)	50 mL	2x120 mL
漂洗液 WS(浓缩) (Wash Solution(conc.))*	12mL	2x24 mL
无内毒素洗脱缓冲液 eEB (Enhanced Elution Buffer)	10 mL	30 mL
Visual Blue	200 μ L	600 μ L
RNase A (10mg/mL)	250 μ L	1200 μ L

注:

*平衡液CBS用于质粒提取前柱子的平衡处理, 可以活化硅胶膜, 有利于提高质粒的产量。

*漂洗液WS在使用前应按1:4比例加入乙醇。

◆ 产品特点简介:

- 吸附柱容量: 1000~3000ug (不同大小质粒有差异)。
- 本试剂盒采用碱裂解法分离质粒, 通过优化溶液体系, 并结合膜吸附技术特异性吸附质粒, 可以获得高产量、低内毒素水平的质粒, 具有高效、快速、方便、经济实惠的特点。
- 一般常规试剂盒提取的质粒内毒素水平会超过 1000EU/ug。而使用本试剂盒可获得很好的满足转染等实验要求的无内毒素质粒, 如对于中高拷贝数的质粒, 内毒素水平一般 <0.1EU/ug。

◆ 保存温度:

- RNase A: 建议 2~8℃保存, 长期保存可置于-20℃保存。室温(25℃)可稳定保存一个月以上。
- 大提质粒不建议将 RNase A 加入到溶液 SI 中, 而是改为提取质粒时, 加到溶液 SIV 步骤后面, 可以充分发挥 RNase A 的活性, 最大限度降低 RNA 对后面质粒提取的影响。
- 试剂盒其余组分于室温 (15℃~25℃) 可以稳定存放 1.5 年而使用活性无明显衰减。室温过高或需要更长期保存, 请放置于 2~8℃。

◆ 运输温度:

- 室温运输。如果温度高于 30℃, 请酌情放置冰袋运输。

◆ 自备试剂、设备及耗材等

- 无水乙醇 (配漂洗液 WS 用)
- 50ml 离心管若干 (收菌及处理上清), 建议用 KG2811
- 可使用 50ml 离心管的水平离心机, 转速可达 4000rpm
- 5ml 或 10ml 移液器及枪头 (全程操作以移液器取液为主)

◆ 实验前准备:

- 第一次使用产品前, 请仔细阅读说明书。
- 检查漂洗液 WS 是否按照要求加入乙醇。
- 室温较低时, 请检测溶液 S II 中是否有沉淀。若有沉淀, 请于 37℃保温溶解, 待恢复到室温后使用。
- 过夜培养的状态良好的菌液。

◆ 菌液培养及用量:

- 质粒提取量的多少, 除了质粒拷贝数的特性外, 菌液培养的状态也是影响质粒提取量的重要因素。
- 使用较少的培养基和较高的转速保证培养液的通气条件, 是菌液生长良好的关键因素。
- 强烈建议先取 2ml 菌液做小提质粒, 检测一下质粒的含量及质量, 看是否适合用于质粒大量提取。
- 做质粒的中量及大量提取时, 我们建议使用 2YT 这类营养丰富的培养基, 可以获得较高的菌体浓度。
- 一般使用 LB 培养基时, 我们建议使用 100ml~200ml 菌液。使用 2YT 培养基时, 最多使用不超过 100ml 菌液, 或者每管收集菌体的湿菌重量不超过 1.0 克, 否则会导致菌液裂解不充分而影响质粒质量及产量, 降低超螺旋质粒的比例。

◆ 菌液暂存条件:

- 如果菌液不能立即用于质粒提取, 可先将菌液放置于-20℃, 快速的将菌液温度降至 0℃左右, 然后转入 4℃存放。保存的菌液在两天之内用于质粒提取, 不会明显影响提取的质粒质量。

◆ 溶液eDBS使用注意事项:

- 溶液 eDBS 用于将质粒结合到柱子上, 正确使用非常关键。
- 首先要准确估算上步得到的上清液体积, 一般使用一个刻度比较准确的 50ml 离心管来估算体积。
- 其次, 准确加入 40%体积比的 eDBS, 尤其要注意枪头中残留的没有加到溶液中的死体积。如有必要, 将移液器调大一个刻度, 将这些死体积考虑进去。
- 在实验操作步骤 10 中, 按照正确的比例准确加入 eDBS 很重要。很多时候提取的质粒量与期望值相差放多, 多半问题都发生在这一步。

使用水平离心机快速操作指南

以下是以常用的可以达到 **4000rpm** 速度的水平离心机做参考。
本试剂盒配备的 **DNA 吸附柱 GP7** 由于角度问题，需使用水平离心机操作，不适合角转子离心机。

➤ DNA 吸附柱平衡处理

1. 将吸附柱 GP7 放于 50ml 收集管中，向吸附柱中加入 4ml 平衡液 CBS，将其快速离心到约 **500rpm**，静置 **5~10min**，让溶液充分浸润吸附膜。然后 **4,000rpm** 离心 **3min**，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中备用。

注意事项：

- 请使用当天处理过的 DNA 吸附柱。
- 瞬时离心，可以使平衡液 CBS 充分浸润到吸附膜中。

➤ 菌体收集

2. 根据菌液生长的状态，使用自备 50ml 离心管，取适当量过夜培养的菌液，**4000rpm** 离心 **10min**，收集菌体，并倒尽上清。

注意事项：

- 根据试剂盒首页说明收集适量菌液，用于质粒提取
- 对于较低拷贝数的质粒，可以考虑平行做 2 份菌液，处理所得上清最后通过多次离心收集到一个吸附柱中，以增加产量。

➤ 菌体收集及裂解

3. 加入 12ml 溶液 SI，用振荡器充分悬浮细菌。

注意事项：

- 不要残留细小菌块，否则会影响裂解，导致质粒产量和质量下降。
- 此步可加入 50μl Visual Blue 指示剂，用于监控后面处理是否充分。

4. 加入 12ml 溶液 SII，立即温和并充分地上下翻转混合 4-6 次，使菌体充分裂解，直至形成均匀透亮的溶液，此步骤不宜超过 5min。
5. 加入 9.6ml 溶液 SIV，温和并充分地上下翻转混合 8~10 次，然后向每管加入 100μl RNase A，室温放置 10min。然后 **4,000rpm** 离心 8min。

注意事项：

- 充分中和的上清液，应生成大量的白色絮状沉淀，且没有局部粘稠物存在。
- 如果在第 3 步加了 Visual Blue 指示剂，则此步溶液蓝色完全消失。
- 如果 RNase A 已经预先加到了溶液 SI 中，则此步无需再加 RNase A。

➤ 收集上清液并进行内毒素清除操作

6. 准备一个新的过滤器，拔掉推杆，放于 50ml 离心管口，然后小心的将第 5 步离心得到的上清液倒入过滤器，重新插入推杆，小心推动推杆，将上清液过滤到 50ml 离心管中。此步骤能够得到约 30~32ml 上清液，然后加入 3ml GETR 溶液，并颠倒混匀。然后于冰水浴中冷却 5~10min，期间可以颠倒摇匀几次，使 GETR 与内毒素充分接触。冷却后的溶液变成蓝色透明状。GETR 溶液比较粘稠，注意缓慢加入以保证加入比较准确的体积。
7. 将上一步的溶液转到 42℃ 水浴中，放置 5min，溶液重新变浑浊，甚至蓝色有机相会部分聚集到管底。
8. **4,000rpm**，室温离心 5min，溶液将分为无色的上层水相和蓝色的下层有机相。由于离心速度限制，溶液分层可能不是非常清晰。将离心管静置 5~10 分钟，溶液将分层更清晰。

注意事项：

- 下层溶液离心后体积会变大，属正常现象，不会造成质粒损失。

9. 将上层溶液转移到一个新的 50ml 带刻度离心管中。该步操作，可以小心的直接将上清慢慢倒入新离心管中，一般下层蓝色有机相比较粘稠，熟练操作时，一般不会随上层水相倒出来。
10. 根据离心管的刻度估算倒出来的上清液体积，准确加入 40% 体积的 eDBS 缓冲液，转入到正常的质粒提取环节即可

注意事项：

- 此步准确的估计上清液体积并按照 40% 比例加入溶液 eDBS 很重要。eDBS 加入不足，会严重影响质粒产量，反之，过大比例的 eDBS 会导致提取的质粒中含有较多的 RNA 干扰，造成浓度虚高。

➤ 质粒吸附、漂洗

11. 将步骤 10 得到的滤液，分多次转移至吸附柱 GP7 中进行质粒 DNA 吸附。每次吸取不超过 20ml 滤液加入吸附柱，**4,000rpm** 离心 2min。多次操作，直到所有溶液都通过吸附柱 GP7。
12. 将 DNA 吸附柱重新放回收集管中，加入 10ml 溶液 eDBS，**4,000rpm**，室温离心 2min，倒掉收集管中废液。
13. 将吸附柱重新放回收集管中，加入 10ml 漂洗液 WS，**4,000rpm**，室温离心 2min，倒掉收集管中废液。
14. 重复步骤 13 一次。

➤ 空甩甩干

15. 倒掉收集管中废液，**4,000rpm**，室温离心 5min，彻底去除漂洗液 WS（此步骤不可省略）。然后将吸附柱 GP7 放入一个新的 50ml 收集管中（试剂盒中标配的），开盖室温或 37℃ 放置 5min，以晾干吸附膜中残留的漂洗液 WS。

➤ 质粒洗脱

16. 在吸附柱的膜中央加入 1.5ml 洗脱缓冲液 EB，室温或者 37℃ 放置 5~10min，以充分浸润吸附膜。
17. **4,000rpm**，室温离心 3min，离心管中的液体即为包含目的质粒的溶液。

洗脱质粒注意事项：

- 质粒洗脱这一步，加入足量的洗脱缓冲液 EB 比较重要。应确保加入洗脱液后吸附膜表面呈现湿润的状态，否则需要再补加洗脱缓冲液。一般 1.2~1.5ml 洗脱缓冲液的体积是足够的。
- 加入洗脱液后，放置充足的时间，是将质粒从膜上洗脱下来的关键。
- 一般将第一次洗脱能够洗下来的溶液重新吸到膜上，进行第二次洗脱，可以提高 10%~20% 的回收率。
- 如果第一次洗脱的质粒浓度超过 1500ng/ul，有必要再洗脱一次质粒，并独立收集，通常洗脱液中还会有较高浓度质粒。

➤ 质量检测

18. 测定质粒浓度，并取 1~3μl（视质粒浓度定）进行琼脂糖凝胶电泳，检测所提质粒的质量。纯化好的 DNA 可立即用于后续实验或 -20℃ 冻存。

注意事项：

- 如需电泳检测质粒超螺旋等情况，建议质粒加样量不超过 500ng。电泳时加入过多的质粒，会跑成一片，无法评估质粒质量。