

## 去内毒素质粒中提试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术, 适合于从 30~50ml 细菌培养液中提取高浓度和高产量的低内毒素质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 0.5mg, 内毒素含量 $<1\text{EU}/\mu\text{g}$ , 浓度高达  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 可直接用于细胞转染和动物注射等。40 分钟可以完成整个抽提工作, 操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提, 也无需用到耗时的醇类沉淀。

### 产品组份

产品编号	P1113-01	P1113-02	P1113-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E3	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E4	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E5	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PVW2*	3 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	30 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
HiPure EF Midi Column	2	10	50
1.5 ml Collection Tubes	2	10	50

版本号: 2019-01

### 保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存, 长期保存(>3 个月)放置于  $-20\sim 8^{\circ}\text{C}$ 。低温下保存, Buffer P2/E4 会有沉淀形成,  $55^{\circ}\text{C}$  水浴使沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 加入~0.5ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 中，于 2-8℃ 保存，有效期为 6 个月。
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
- 灭菌的 15ml 离心管，用于收集 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 低温下，Buffer E4 有沉淀析出，于 55℃ 温浴溶解。

## 实验步骤（高拷贝数方案）

1. 将含目的质粒的菌种接种于含有 1 ml LB/抗生素培养基的 10ml 培养管中，37℃ 摇床培养 6~8 小时小量扩增菌液。  
不要用 TB 或 YT 等丰富培养基进行培养细菌。使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。菌种保存过程中存在质粒丢失现象，甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线活化后，挑取单菌落进行小量扩增，不要直接用甘油保藏菌种进行小扩培养。培养瓶或培养管的体积必须大于或等于培养液体积的 4 倍。
2. 在 0.2~0.3L 培养瓶中加入 30~50ml 含抗生素 LB 培养液，接种 0.1% 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 14~16 小时扩增菌液。  
不要用 TB 或 YT 等丰富培养基进行培养细菌。使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。
3. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 30~50ml 菌液。
4. **倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。加入 2.5ml Buffer E1/RNase A，高速涡旋重悬细菌。**  
彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。RNase A 可以预先加入 Buffer E1 中，该混合液可在 2-8℃ 保存 6 个月。
5. **涡旋 5 秒重悬细菌，加入 2.5 ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。** 室温放置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀 2~3 次。  
轻轻颠倒混匀，不要涡旋。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。处理多个样品时，总操作时间不要超过 4 分钟。
6. **加入 2.5 ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 10~15 次或直至样品充分混匀。**  
加入 Buffer E3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。菌液用量较多时，中和也会较难进行，中和时需要稍用力颠倒数次至溶液彻底中和。

7. 3,000~5,000 × g 离心 5~10 分钟。
8. **取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第七步的上清倒入过滤器中。**把过滤器的出水口对准已准备好的 50ml 离心管。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 50ml 离心管中。  
为了监控 DNA 的得率，取 0.3ml 上清液至新的离心管，加入 90ul 异丙醇混匀，转移至 DNA 结合柱(质粒小提试剂盒)进行离心过柱，按小提试剂盒进行洗涤和洗脱，计算出 DNA 的得率。
9. **测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4(~2.2 ml)至滤液中，**颠倒混匀 6-8 次。  
这一步的温度必须控制在 15~30°C，低于 15 度时，DNA 的得率会降低。
10. **将 HiPure EF Midi Column 套在 15ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**3,000 × g 离心 2 分钟。
11. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，把剩余混合液转移至柱子中。**3,000 × g 离心 2 分钟。
12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 4ml Buffer E5 至柱子中。**3,000 × g 离心 2 分钟。
13. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 4ml Buffer PW2 至柱子中。静置 2 分钟，**3,000 × g 离心 2 分钟。
14. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 4ml Buffer PW2 至柱子中。**3,000~5,000 × g 离心 10 分钟。  
为确保彻底去除乙醇，建议取吸附柱，室温放置 10~15 分钟晾干吸附膜。
15. **把柱子套在灭菌的 15ml 离心管中(自备)。**加入 0.3~0.5ml Buffer TE 至柱子膜中央。静置 2 分钟。3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
16. **把洗脱液重新转移至柱子膜中央，**3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20°C。

### **附加方案 (低拷贝数载体，处理质粒产量低于 2ug/ml 菌液的载体)**

1. 按高拷贝的第 1~8 步进行操作准备上清液。
2. 测量滤液体积，加入 0.3 倍体积的异丙醇至滤液中，颠倒混匀 6-8 次。
3. **将 HiPure EF Midi Column 套在 15ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**3,000 × g 离心 2 分钟。

4. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**把剩余混合液转移至柱子中**。3,000 × g 离心 2 分钟。
5. 按第 13-16 步进行操作。（该方案不可以用 Buffer E5 进行洗涤。）

## 常见问题

### 1. DNA 产量低

- **质粒拷贝数：**载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2~3 倍的产量波动，(每毫升培养过夜的菌液，高拷贝数的质粒载体产量为 4~16μg)。长片段质粒(>8KB)和表达型载体常以中低拷贝数为主，每毫升菌液的产量约为 0.5~2μg。
- **菌种问题：**菌种保存过程中存在质粒丢失现象，养菌前最好先划线活化，以稳定产量。
- **细胞未充分裂解：**细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **低温离心：**加入 Buffer E4 后，不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误：**Buffer E4 不能低温放置，Buffer P2/E4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PV2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer E4 体积：**Buffer E4 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer E4 会导致产量的波动。
- **低拷贝数和长片段载体：**本产品对低拷贝数和长片段的载体(>8KB)抽提效率较低，建议使用 magen 公司的 HiPure Plasmid/BAC EF Kits 进行抽提。
- **洗脱不充分：**再加入 0.2ml Buffer TE 至柱子膜中央进行第三次洗脱。

### 2. RNA 污染

- **RNASE 的用量和保质期：**RNASE A 加入量为常规产品的 2 倍，使用时 Buffer P1/RNase 不要与其产品交互使用。Buffer P1/RNase 保存时间不要超过 6 个月。
- **菌液培养时间：**本产品对 RNA 污染较为敏感，建议细菌培养时间为 16 小时，以降低菌液中 RNA 的丰度。
- **去除 RNA 污染：**处理某些菌液时，得到的质粒可能存在 RNA 污染，通过醇类重沉淀可以去除 RNA。简易沉淀流程：加入 0.1 倍体积 3M 醋酸钠(pH5.5)和 0.7 倍体积的异丙醇至质粒溶液中，混匀后高速离心沉淀收集 DNA，用 70%乙醇洗涤除盐，空气干燥加入灭菌水溶解。详细可参照分子克隆等。