



# SteadyPure 无内毒素质粒中量提取试剂盒（柱膜法）

SteadyPure Endo-free Plasmid DNA Extraction Midi Kit ( Spin Column )

Code No. AG21041

**包装量:** 50 rxns  
**保存温度:** Package 2-1 -20°C  
 Package 2-2 室温 (15-30°C)

## 产品概述

本产品可从  $OD_{600} \leq 40$  OD (例如: 菌液 OD 值为 2.0 时, 菌液体积为 20 ml) 的培养菌液中提取获得多至 70  $\mu$ g 无内毒素质粒 DNA。本产品采用优化的碱裂解法, 使用硅胶膜吸附技术结合独特的内毒素清除系统和漂洗系统, 可在提取质粒的同时有效去除内毒素、蛋白质等杂质。纯化获得的质粒 DNA 收量高, 内毒素含量低, 可直接用于转染、体外转录翻译、酶修饰等分子生物学实验。

## 安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂, 实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套, 然后再进行实验操作。

**【注意: 实验过程中产生的废液需要收集在废液桶中专门处理。】**

如果 Buffer PLS-2 或 Buffer PWA 不小心溅到皮肤表面, 请立刻用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

## 产品组成<sup>\*1</sup>

RNase A (10 mg/ml)	280 $\mu$ l
Buffer PRS-2 <sup>*2</sup>	28 ml
Buffer PLS-2	25 ml
Buffer PBS-2	25 ml
Buffer ER	8 ml
Buffer PWA	25 ml
Buffer PWB-2 <sup>*3</sup>	27 ml
Endo-free Elution Buffer	10 ml
Plasmid DNA Midi Columns	50 sets
Collection Tubes	50 pcs
RNase Free Tubes	50 pcs

\*1: RNase A (10 mg/ml) 包装于 Package 2-1 中, 需放置于 -20°C 保存; 其余组分均包装于 Package 2-2 中, 室温 (15 ~ 30°C) 保存。

\*2: Buffer PRS-2 首次使用前, 需要将 RNase A 加入 Buffer PRS-2 中 (RNase A 与 Buffer PRS-2 体积比为 1 : 100), 混合均匀后在瓶子上做好标记。加入了 RNase A 后的 Buffer PRS-2 需保存在 2 ~ 8°C, 可保存 6 个月。

\*3: Buffer PWB-2 在首次使用前, 请添加 63 ml 无水乙醇 (Buffer PWB-2 与无水乙醇体积比为 3 : 7), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温保存。

## 保存及运输

保存温度: Package 2-1 -20°C 保存

Package 2-2 室温 (15-30°C) 保存

运输温度: Package 2-1 干冰或 -20°C 冰袋运输

Package 2-2 室温运输

## 实验前准备

1. 无水乙醇、异丙醇、无热源吸头、无热源离心管、水浴锅。
2. 若 Buffer PLS-2 出现沉淀, 请于 37°C 加热直至沉淀消失, 然后使用。
3. 洗脱结合于 Plasmid DNA Midi Columns 上的质粒 DNA 时, 将 Endo-free Elution Buffer 或 Endo-free water (需自备) 加热至 50 ~ 65°C 使用, 将会提高质粒 DNA 的洗脱效率。

## ► 注意事项

1. 在相同质量的菌体中，质粒拷贝数不同（高拷贝或低拷贝），纯化获得的质粒 DNA 收量存在差异。一般情况下，若提取高拷贝质粒（如：pUC19 等），建议使用 5 ~ 15 ml 过夜培养的菌液，可以纯化得到 20 ~ 70 μg 质粒 DNA；若提取低拷贝质粒（如：pBR322 等），建议使用 10 ~ 20 ml 过夜培养的菌液，可以纯化得到 5 ~ 10 μg 左右质粒 DNA。
2. 用来制备质粒的菌株对纯化的质粒 DNA 质量有很大的影响。宿主菌株 DH1、DH5α 和 C600 使用本产品可获得高质量的质粒 DNA。菌株 HB101 系列、TG1 系列和 JM100 系列，含有大量的次级代谢物（如碳水化合物），这些次级代谢物会影响质粒 DNA 的酶切及连接等应用。此外，一些菌株，如 JM101、JM110 和 HB101，具有高水平的内切酶活性，会导致质粒 DNA 的收量降低及超螺旋质粒占比下降。如果纯化获得的质粒 DNA 纯度及完整性不符合预期，建议考虑更换宿主菌株。
3. 菌体的生长状态对纯化获得的质粒 DNA 纯度、产量及完整性都有较大的影响。我们建议收集的菌体应处于菌体的对数生长期（一般情况下培养 12 ~ 16 小时）。低温下长期保存的菌体建议涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行菌体培养。
4. 本产品提供的操作方法可从  $OD_{600} \leq 40$ （例如：菌液 OD 值为 2.0 时，菌液体积为 20 ml）的菌体中提取获得质粒 DNA。菌体的上样量不要超过推荐的最大起始量（ $OD_{600} \leq 40$ ），菌量太大影响溶菌及质粒 DNA 的释放，纯化时会影响质粒 DNA 的纯度。若样本起始量  $OD_{600} > 40$ ，请按比例增加 Buffer PRS-2、Buffer PLS-2、Buffer PBS-2 的试剂用量。
5. *Plasmid DNA* Midi Column 最大容积为 750 μl，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分次加入（上样 750 μl 上清液后，离心弃滤液，然后将剩余混合液再次上样，重复此步骤），或使用多个 *Plasmid DNA* Midi Columns 进行纯化。
6. 加入 Buffer PLS-2 和 Buffer PBS-2 后，不能剧烈混匀，剧烈混匀会导致菌体基因组 DNA 的释放，从而污染质粒 DNA。
7. 加入 Buffer PBS-2 后，应轻柔并充分混匀。若混匀不充分可能会导致不能形成白色团状物，不利于离心沉淀，此时应加大混匀力度及次数，使其形成白色团状物，再离心沉降于离心管底部。
8. 操作过程中，应预防内毒素污染，需注意以下几方面：
  - ① 操作环境应防止菌体污染。
  - ② 操作过程中所使用的离心管（废液收集管除外）、移液管、吸头须无热原无内毒素，玻璃器皿须经 180°C 过夜处理。
9. 可使用 Endo-free Elution Buffer 或 Endo-free water（需自备）洗脱质粒 DNA；纯化的质粒 DNA 需长期保存时，建议在 Endo-free Elution Buffer 中保存。
10. 纯化的质粒 DNA 可于 4 °C 暂存，长期保存请放置于 -20 °C。



> 操作流程

**菌体收集**

1. 取 5~20 ml 过夜培养的菌液 (菌液总 OD<sub>600</sub> ≤ 40), 12,000 rpm 室温离心 2 min, 弃上清。

【注: ① 菌液超过 15 ml 时, 建议将菌液分多次收集于一个 15 ml 离心管中。

② 高拷贝质粒: 建议收集 5~15 ml 过夜培养菌液; 低拷贝质粒: 建议收集 10~20 ml 过夜培养菌液。

③ 若收集的菌液总 OD<sub>600</sub> 值大于 40, 建议在上述 2~4 步骤中按比例增加试剂的用量。】

**重悬、裂解及中和**

2. 向上述收集了菌液的离心管中加入 500 μl 的 Buffer PRS-2 (含 RNase A), 使用涡旋振荡或移液器反复吹打等方式, 充分悬浮菌体沉淀, 直至悬浮液中没有菌块残留。将悬浮液转移至 2 ml 离心管中进行后续操作。

【注: 请确认 Buffer PRS-2 中已加入 RNase A (RNase A 与 Buffer PRS-2 体积比为 1:100) 。

3. 向上述悬浮液中加入 500 μl 的 Buffer PLS-2, 轻柔上下颠倒混匀 6~8 次, 至溶液变透明, 此时溶液比较粘稠。

【注: 溶液混匀需轻柔, 切勿剧烈混匀, 剧烈混匀会导致菌体基因组 DNA 的释放, 从而污染质粒 DNA。】

4. 向上述裂解液中加入 500 μl Buffer PBS-2, 此时溶液中会出现白色团状物。轻柔上下颠倒混匀 6~8 次。

【注: ① 步骤 3、4 总时长不宜超过 5 min。

② 溶液混匀需轻柔, 切勿剧烈混合, 剧烈混合会导致菌体基因组 DNA 的释放, 从而污染质粒 DNA。】

5. 静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 10 min, 取上清。



500 μl Buffer PRS-2  
500 μl Buffer PLS-2  
500 μl Buffer PBS-2  
离心 10 min  
取上清

**以下步骤请使用无热源吸头及无热源离心管, 避免内毒素污染!**

**内毒素清除**

6. 将上述上清液全量转移至新的 1.5 ml 离心管 (需自备) 中, 加入 0.1 倍上清液体积的内毒素清除剂 Buffer ER (上清液体积的 10%), 颠倒混匀 5~10 次, 此时溶液变浑浊。

【注: 使用 1.5 ml 离心管进行后续的离心分层操作效果较好, 若上述溶液体积大于 1.5 ml, 可将溶液分成两管进行后续操作。】

7. 冰浴 5 min, 期间颠倒混匀 1 次, 此时溶液呈澄清透亮的蓝色。

8. 42°C 水浴 5 min, 期间颠倒混匀 1 次, 此时溶液重新变浑浊。

9. 25°C 以上条件下, 8,000 rpm 离心 5 min, 溶液分 2 层, 上层为透明的水相, 下层为油滴状蓝色沉淀。

【注: ① 离心过程中温度需大于 25°C, 温度过低, 可能无法有效分层。

② 若分层不彻底, 可适当下调离心机的转速, 不同离心机的转速可能不一致, 可根据具体情况调整。

③ 下层油滴状蓝色沉淀含有内毒素, 转移上清时应避免吸到沉淀。】



0.1 倍体积 Buffer ER  
冰浴 5 min  
水浴 5 min  
离心 5 min  
取上清

## 结合

10. 转移上述上清液至新的 2 ml 或 5 ml 无热原离心管中，加入 0.4 倍上清液体积的异丙醇（上清液体积的 40%），上下颠倒使溶液充分混匀。

【注：异丙醇加入过多可能导致 RNA 污染，加入过少可能导致质粒 DNA 收量较低。】

11. 将上述混合液分次转移至 *Plasmid DNA* Midi Column 中，每次转移体积不超过 750  $\mu$ l，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。重复此步骤直至所有混合液通过 *Plasmid DNA* Midi Column。

【注：*Plasmid DNA* Midi Column 最大容积为 750  $\mu$ l，单次转移时液体的体积不可超出吸附柱最大容积。】



0.4 倍体积异丙醇  
上柱结合  
离心 1 min

## 漂洗

12. 向 *Plasmid DNA* Midi Column 中加入 500  $\mu$ l 的 Buffer PWA，12,000 rpm 室温离心 5 min，弃滤液。

13. 向 *Plasmid DNA* Midi Column 中加入 750  $\mu$ l 的 Buffer PWB-2，12,000 rpm 室温离心 2 min，弃滤液。

【注：请确认 Buffer PWB-2 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】

14. 重复步骤 13 一次。

15. 将 *Plasmid DNA* Midi Column 安置于新的 2.0 ml Collection tube 上，12,000 rpm 室温离心 2 min。

【注：此步骤目的是去除残余的漂洗液，避免残留的漂洗液影响质粒 DNA 的纯度。】



500  $\mu$ l Buffer PWA 洗一次  
750  $\mu$ l Buffer PWB-2 洗两次

## 洗脱

16. 将 *Plasmid DNA* Midi Column 安置于新的 RNase Free Tube 上，向 *Plasmid DNA* Midi Column 膜的中央处加入 50  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l Endo-free Elution Buffer 或 Endo-free Water（需自备），室温放置 2 min。

【注：① 将 Endo-free Elution Buffer 或 Endo-free Water（需自备）加热至 50 ~ 65 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。

② 质粒拷贝数较低或对获得的质粒浓度要求较高时，可适当降低洗脱体积，但洗脱体积尽量不要低于 50  $\mu$ l，否则可能会降低洗脱效率，减少质粒收量。】

17. 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱获得质粒 DNA。若立即用于后续实验可于 4  $^{\circ}$ C 暂存，长期保存请放置于 -20  $^{\circ}$ C。



50  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l  
Endo-free Elution Buffer 或  
Endo-free Water  
离心