

SteadyPure 无内毒素质粒超大量提取试剂盒（柱膜法）

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

Code No. AG21043

包装量: 10 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 $OD_{600} \leq 600$ OD (例如: 菌液 OD 值为 2.0 时, 菌液体积为 300 ml) 的培养菌液中提取获得多至 1 mg 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^{*1}

RNase A (10 mg/ml)	1.2 ml
Buffer PRS-2 ^{*2}	120 ml
Buffer PLS-2	100 ml
Buffer PBS-2	100 ml
Buffer ER	30 ml
Buffer PWA	80 ml
Buffer PWB-2 ^{*3}	75 ml
Endo-free Elution Buffer	20 ml
Column Filter	10 pcs
Plasmid DNA Ultra Columns	10 sets
RNase Free Tubes	10 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 175 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, 室温下保存。

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、移液管、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 Ultra 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 100~200 ml 过夜培养的菌液，可以纯化得到 200~1000 μg 质粒 DNA；若提取低拷贝质粒（如：pBR322 等），建议使用 200~300 ml 过夜培养的菌液，可以纯化得到 50~150 μg 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、DH5 α 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 $\text{OD}_{600} \leq 600$ （例如：菌液 OD 值为 2.0 时，菌液体积为 300 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（ $\text{OD}_{600} \leq 600$ ），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。如果样本起始量 $\text{OD}_{600} > 600$ 时，请按比例增加 Buffer PRS-2、Buffer PLS-2、Buffer PBS-2 的试剂用量。
5. *Plasmid DNA Ultra Column* 的最大容积为 10 ml，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分次加入（上样 10 ml 上清液后，离心弃滤液，然后将剩余液体再次上样，重复此步骤），或使用多个 *Plasmid DNA Ultra 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 暂存，长期保存请放置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。



➤ 操作流程

菌体收集

1. 取 100 ~ 300 ml 过夜培养的菌液（菌液总 OD₆₀₀ ≤ 600），8,000 rpm 室温离心 3 min，弃上清。

【注：① 菌液超过 50 ml 时，需要将菌液分多次收集于一个 50 ml 离心管中。

② 高拷贝质粒：建议收集 100 ~ 200 ml 过夜培养菌液；低拷贝质粒：建议收集 200 ~ 300 ml 过夜培养菌液。

③ 若菌液总 OD₆₀₀ 值大于 600，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. 向上述收集了菌体的离心管中加入 10 ml 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。

【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 10 ml 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，剧烈混合会导致菌体基因组 DNA 的释放，从而污染质粒 DNA。】

4. 向上述裂解液中加入 10 ml 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，切勿剧烈混匀，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，8,000 rpm 室温离心 15 min，取上清。

过滤除杂 < 可选步骤 >

若需将碱裂解后的上清液进一步过滤除杂，可进行此操作，若转移的上清液无明显杂质可省略此步骤，直接进入<操作流程-内毒素去除>。

6. 将离心后的上清液转移至 Column Filter 中，缓慢推动推柄过滤，滤液收集在新的 50 ml 离心管（需自备）中。

【注：转移上清液时，动作应轻柔，注意不要触碰沉淀。】

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！

内毒素去除

7. 向上述上清液中加入 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。

8. 冰浴 15 ~ 20 min，期间每 10 min 颠倒混匀 1 次，直至溶液呈澄清透亮的蓝色。

9. 42°C 水浴 5 min，期间颠倒混匀 1 次，此时溶液重新变浑浊。

10. 适当下调离心机的降速，8,000 rpm，25°C 以上条件下离心 10 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，可继续下调离心机的降速，不同离心机的降速可能不一致，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。】

结合

11. 转移上述上清至新的 50 ml 离心管（需自备）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：异丙醇加入过多易导致 RNA 污染，加入过少可能导致质粒收量较低。】

12. 将上述混合液分次转移至 *Plasmid DNA Ultra Column* 中，每次转移体积不超过 10 ml，8,000 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 Ultra Column*。

【注：*Plasmid DNA Ultra Column* 最大容积为 10 ml，单次转移时液体的体积不可超出吸附柱最大容积。】

漂洗

13. 向 *Plasmid DNA Ultra Column* 中加入 7.5 ml Buffer PWA，8,000 rpm 室温离心 5 min，弃滤液。

14. 向 *Plasmid DNA Ultra Column* 中加入 10 ml Buffer PWB-2，8,000 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。】

15. 重复步骤 14 一次。

16. 使用移液枪将 *Plasmid DNA Ultra Column* 内圈压环上残余的漂洗液吸尽，8,000 rpm 室温空管离心 2 min。

【注：请尽可能吸尽内圈压环上残余的漂洗液，避免残余的漂洗液影响质粒 DNA 的纯度。】

洗脱

17. 将 *Plasmid DNA Ultra Column* 安置于新的 50 ml 的离心管（需自备）上，向 *Plasmid DNA Ultra Column* 膜的中央处均匀地加入 500 μ l ~ 1000 μ 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°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 500 μ l，否则可能会降低洗脱效率，减少质粒收量。】

18. 8,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱获得质粒 DNA。纯化的质粒 DNA 可转移至 RNase Free Tube 中，若立即用于后续实验可于 4 °C 暂存，长期保存请放置于 -20 °C。