

SteadyPure 无内毒素质粒提取试剂盒 Ver.2

SteadyPure Endo-free Plasmid DNA Extraction Kit Ver.2

Code No. AG21028

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 $OD_{600} \leq 600$ (例如: 菌液 OD 值为 2.0 时, 菌液体积为 300 ml) 的培养菌液中提取各种无内毒素质粒 (Plasmid、Cosmid 等)。采用了优化的碱裂解法, 结合阴离子交换树脂和独特的内毒素清除系统, 可有效去除内毒素、蛋白等杂质, 然后通过异丙醇沉淀法脱盐浓缩, 最后溶解于 Endo-free TE Buffer 或 Endo-free water 中, 即可获得高产量高纯度的质粒 DNA。纯化获得的质粒 DNA 内毒素含量 $< 0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$, 可直接用于转染、体外转录翻译、酶修饰等分子生物学实验。

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 ~ 500 μg 高纯度质粒 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 100 ~ 150 μg 高纯度质粒 DNA。

> 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 PEL、Buffer PLS 不小心溅出, 请立刻用清水擦拭干净。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

> 产品组成*

RNase A (10 mg/ml) ²	1.2 ml
Buffer PEL	100 ml
Buffer PRS ²	120 ml
Buffer PLS	100 ml
Buffer PBS	100 ml
Buffer ER	30 ml
Buffer PWB	250 ml
Endo-free Elution Buffer	100 ml
Endo-free water for 70% ethanol ³	18 ml
Endo-free TE Buffer	10 ml
Column Filter	10 pcs
Endo-free Plasmid DNA Columns	10 pcs
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 首次使用前, 需要将 RNase A 加入 Buffer PRS 中 (RNase A 与 Buffer PRS 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 需保存在 2 ~ 8°C, 可保存 6 个月。

*3: Endo-free water for 70% ethanol 首次使用前, 需要吸取 42 ml 自备的无水乙醇加入其中, 配制 70% ethanol 备用。

➤ 实验前准备

1. 自备: Endo-free water、异丙醇、无热原无内毒素的离心管、移液管、枪头等。
2. 温度较低时组分 Buffer PLS、Buffer PBS 会出现沉淀, 使用前可于 37°C 加热直至沉淀消失, 然后再使用。
3. Buffer PLS 不可剧烈摇晃, 以免产生气泡。
4. 洗脱结合于 Endo-free Plasmid DNA Columns 上的质粒 DNA 时, 将 Endo-free Elution Buffer 加热至 50 ~ 65°C 使用, 将会提高 DNA 的洗脱效率。
5. Buffer PRS 首次使用前, 需要将 RNase A 加入 Buffer PRS 中 (RNase A 与 Buffer PRS 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 需保存在 2 ~ 8°C, 可保存 6 个月。
6. Endo-free water for 70% ethanol 首次使用前, 需要吸取 42 ml 自备的无水乙醇加入其中, 配制成 70% ethanol 备用。

➤ 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 干冰运输或 -20°C 冰袋运输

Package 2-2 室温 (15 ~ 30°C) 运输

➤ 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 ~ 500 μg 高纯度质粒 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 100 ~ 150 μg 高纯度质粒 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液体培养。
4. 本产品提供的操作方法可从 OD₆₀₀ ≤ 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 (OD₆₀₀ ≤ 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。
5. 本产品中的 Endo-free Plasmid DNA Columns 搭配独特的漂洗液 Buffer PWB 具有较好的内毒素清除能力, 在不使用 Buffer ER 的情况下, 提取的质粒的内毒素含量极低, 可满足常规细胞转染和其他分子生物学实验的需要, 而对于敏感细胞系转染, 则建议搭配 Buffer ER 使用。
6. 本产品提供的 Column Filter, 外形类似注射器, 通过推动液体通过 Column Filter 可去除杂质 (菌体重悬、裂解、中和后离心可去除大部分白色沉淀, 但上清中可能会残留少许白色絮状沉淀, 可通过 Column Filter 去除)。
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 TE 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 TE 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。

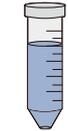
操作流程简图

下图以重力法的纯化操作为例



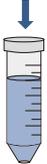
柱平衡

- 向 Endo-free Plasmid DNA Column 中加入 10 ml Buffer PEL，柱中溶液通过重力法流出。



菌体收集

- 收集过夜培养的菌液于离心管中，离心，弃上清。



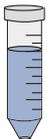
重悬、裂解及中和

- 向上述离心管中加入 10 ml Buffer PRS（含 RNase A）充分悬浮菌体沉淀。
- 向上述悬浮液中加入 10 ml Buffer PLS，轻柔上下颠倒。
- 向上述裂解液中加入 10 ml Buffer PBS，轻柔上下颠倒。
- 室温静置 2 min、离心。



过滤

- 将上清液加入 Column Filter 中，收集滤液。（可选步骤）



内毒素清除

- 加入 0.1 倍溶液体积的内毒素清除剂 Buffer ER。
- 冰浴 15 ~ 20 min，42°C 水浴 5 min。
- 8,000 rpm 25°C 离心 10 min。（可选步骤）



结合及漂洗

- 将上述上清液/滤液转移至已平衡的 Endo-free Plasmid DNA Column 中，柱中溶液通过重力法流出。
- 向上述 Endo-free Plasmid DNA Column 中加入 15 ml Buffer PWB，柱中溶液通过重力法流出。
- 再次向上述 Endo-free Plasmid DNA Column 中加入 10 ml Buffer PWB，柱中溶液通过重力法流出。



洗脱

- 将 Endo-free Plasmid DNA Column 置于新的离心管上，加入 10 ml Endo-free Elution Buffer，柱中溶液通过重力法流出，收集洗脱液。



沉淀

- 向上述离心管中加入 7 ml 异丙醇，颠倒混匀，离心，去上清液。



洗涤

- 加入 5 ml 70% ethanol 清洗质粒 DNA 沉淀，离心，去上清液。
- 室温干燥，去乙醇。



溶解

- 加入 200 ~ 1000 μ l Endo-free TE Buffer 或 Endo-free water 溶解重悬质粒 DNA。



保存

- 转移上述质粒 DNA 溶液至 RNase Free Tubes 中，得到的质粒 DNA 可于 4°C 暂存，长期保存请放置于 -20°C。

操作流程

柱平衡

1. 向 Endo-free Plasmid DNA Column 中加入 10 ml Buffer PEL，柱中溶液通过重力法流出。

菌体收集

2. 收集 100 ~ 300 ml 过夜培养菌液于 50 ml 离心管中，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，加入 50 ml 菌液、离心、弃上清，然后再次加入菌液，重复此步骤；或使用更大容积的离心管；

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。】

重悬、裂解及中和

3. 向上述收集了菌液的离心管中加入 10 ml 的 Buffer PRS（含 RNase A），采用涡旋振荡或用移液器反复吹打等方法充分悬浮菌体沉淀，直至悬浮液中没有菌块残留。

【注：请确定 Buffer PRS 中已加入适当体积的 RNase A（RNase A 与 Buffer PRS 体积比为 1:100）。】

4. 向上述悬浮液中加入 10 ml Buffer PLS，轻柔地上下颠倒 6 ~ 8 次，溶液变透亮，此时溶液比较粘稠。

【注：溶液混匀须轻柔，切勿剧烈混合，剧烈混合可能会导致菌体基因组 DNA 的释放，从而污染质粒 DNA。】

5. 向上述裂解液中加入 10 ml Buffer PBS，此时溶液中出现白色团状物。轻柔上下颠倒混匀 6 ~ 8 次。

【注：① 步骤 4、5 总时长不宜超过 5 min；

② 溶液混匀须轻柔，切勿剧烈混合，剧烈混合可能会导致菌体基因组 DNA 的释放，从而污染质粒 DNA。】

6. 将上述裂解液室温静置 2 min，12,000 rpm 室温离心 15 min。离心后可直接进入<操作步骤 7>，若无需进行<操作步骤 7>，请将澄清的上清液转移至 50 ml 离心管中。

过滤除杂 <可选步骤>

若需将破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、结合、漂洗及洗脱>。

7. 将离心后的上清液转移至 Column Filter 中，缓慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的 50 ml 离心管中。

【注：转移上清液时，动作应轻柔，注意不要触碰沉淀。】

内毒素清除 <可选步骤>

若提取的质粒需应用于对内毒素要求极低的敏感细胞系转染实验，可进行此操作，若只应用于常规细胞转染或其他分子生物学实验，则可省略此步骤，直接进入<操作流程-结合、漂洗及洗脱>。

8. 向上述 50 ml 离心管中加入 0.1 倍溶液体积的内毒素清除剂 Buffer ER（溶液体积的 10%，约 3 ml），颠倒混匀 5 ~ 10 次，此时溶液呈蓝色浑浊。

9. 冰浴 15 ~ 20 min，期间每 5 min 颠倒混匀 2 次，直至溶液呈澄清透亮的蓝色。

10. 42°C 水浴 5 min，此时溶液重新变浑浊。

11. 调整离心机的降速速率，使样品平稳的停止转动。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 如果分层不彻底，可降低离心机降速速率，不同离心机的降速速率可能不一致，可根据具体情况调整；

② 离心过程中温度需大于 25°C，温度过低，可能无法有效分层；

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、漂洗及洗脱

12. 将上述上清液/滤液转移至已平衡好的 Endo-free Plasmid DNA Column 中，柱中溶液通过重力法流出，弃滤液。

【注：① Endo-free Plasmid DNA Column 的最大容积为 15 ml，使用时如果液体的体积超出最大容积，请分次加入；（上样 15 ml 上清液后，流出，然后将剩余混合液再次上样，重复此步骤。）

② 上清液流出液可能呈白色浑浊，属正常现象，不影响质粒提取与后续应用。】

13. 待上一步溶液完全流出后，向 Endo-free Plasmid DNA Column 中加入 15 ml Buffer PWB，柱中溶液通过重力法流出，弃滤液。

14. 待上一步溶液完全流出后，再次向 Endo-free Plasmid DNA Column 中加入 10 ml Buffer PWB，柱中溶液通过重力法流出，弃滤液。

【注：Buffer PWB 流出液可能呈白色浑浊，属正常现象，不影响质粒提取与后续应用。】

15. 待上一步溶液完全流出后，将 Endo-free Plasmid DNA Column 置于新的无热原无内毒素的 50 ml 离心管上，向柱中加入 10 ml Endo-free Elution Buffer 洗脱质粒，柱中溶液通过重力法流出，收集洗脱液。

沉淀、洗涤及溶解

16. 向上述 50 ml 离心管中加入 7 ml 异丙醇，上下颠倒充分混匀，12,000 rpm 4°C 离心 30 min，去除上清液。

【注：① 去除上清液时，动作应轻柔，注意不要触碰质粒 DNA 沉淀，避免沉淀损失，导致质粒 DNA 收量降低；

② 若离心后质粒 DNA 沉淀不紧实，可根据实际需求适当延长离心时间。】

17. 向上述 50 ml 离心管中加入 5 ml 70% ethanol 清洗质粒 DNA 沉淀，12,000 rpm 4°C 离心 5 min，小心去除上清液。

【注：① 请使用本产品中所提供的 Endo-free water for 70% ethanol，向其中加入 42 ml 自备的无水乙醇，配制成 70% ethanol；

② 加入 70% ethanol 应轻柔，避免打散沉淀；

③ 去除上清液时，动作应轻柔，注意不要触碰质粒 DNA 沉淀，避免沉淀损失，导致质粒 DNA 收量降低；

④ 若离心后质粒 DNA 沉淀不紧实，可根据实际需求适当延长离心时间。】

18. 室温干燥质粒 DNA 沉淀至表面乙醇挥发完全（约 10 min），以除去残留的乙醇。

【注：① 若想缩短干燥时间，可短暂离心，用移液器小心去除残留乙醇，室温干燥 2 min ~ 5 min 即可；

② 沉淀不可过分干燥，过分干燥会导致质粒 DNA 难以溶解；

③ 应尽可能地除去上清液，可用移液器吸干残留在管壁和管口的液滴。】

19. 向上述 50 ml 离心管中加入 200 ~ 1000 μ l Endo-free TE Buffer 或 Endo-free water 溶解重悬 DNA，沉淀完全溶解后，转移至 RNase Free Tubes 中，得到的质粒 DNA 可于 4°C 暂存，长期保存请放置于 -20°C。

【注：① 纯化的质粒 DNA 用于 DNA 序列分析时，建议使用 Endo-free water 洗脱质粒 DNA；

② Endo-free TE Buffer 或 Endo-free water 的添加量可根据沉淀量调整，若沉淀量少，可通过减少添加量来提高质粒 DNA 的浓度。】