

# 零内毒素质粒大量提取试剂盒

(使用说明书Ver.1.1.3)

## 产品说明

- ✧ 独特的核酸纯化柱设计，仅20分钟内完成质粒大量提取的制备。
- ✧ 从150ml过夜培养的菌液中纯化高达1.2mg的高浓度质粒DNA。
- ✧ 可制备高纯度、无内毒素 ( $\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$ ) 转染级别质粒DNA。

产品货号：

TD422-10 (10次反应) TD422-20 (20次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

# 目录Contents

产品组份	1
注意事项	1
产品特性	1
产品描述	2
溶液制备	3
操作步骤	4
◇ 负压操作步骤	4
◇ 离心操作步骤	5
简易流程图	6
如何调整质粒结合液的体积	7
FAQ常见问题及解决方法	8
组件查询	9

## 产品组份

试剂盒组成	10次	20次	保存
RNaseA溶液	1ml+0.6ml	2*1ml+0.6ml	4°C
P1	150ml	2*150ml	4°C
P2	150ml	2*150ml	室温
P3	150ml	2*150ml	室温
质粒DNA结合液	150ml	2*150ml	室温
质粒DNA洗涤液1	2*55ml	4*55ml	室温
质粒DNA洗涤液2（未添加乙醇）	2*23ml	4*23ml	室温
质粒DNA洗脱液	10ml	20ml	室温
5号PX纯化柱+15ml漏斗X+50ml漏斗	2*5个	4*5个	室温
注射器内芯	2*5个	4*5个	室温
注射器外套（含滤网）	2*5个	4*5个	室温
3号内毒素去除柱	10个	2*10个	室温
2ml收集管	20个	2*20个	室温

## 注意事项

- ✧ 简石生物产品仅供研究使用，不用于临床诊断。本试剂盒中包含一些刺激性试剂，应在专业人员的指导下进行，并保证实验过程中的安全性与规范性。
- ✧ 试剂盒已通过大量产品质量检测，质保期为一年。
- ✧ 环境温度低时溶液P2中SDS可能会析出沉淀，可在37°C水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- ✧ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
- ✧ 溶液P3和结合液中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- ✧ 质粒DNA的提取率和质量受细菌培养浓度、质粒拷贝数、宿主菌的种类等因素影响。

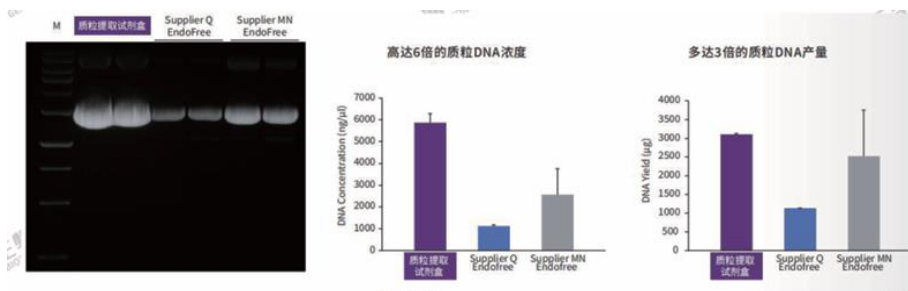
## 产品特性

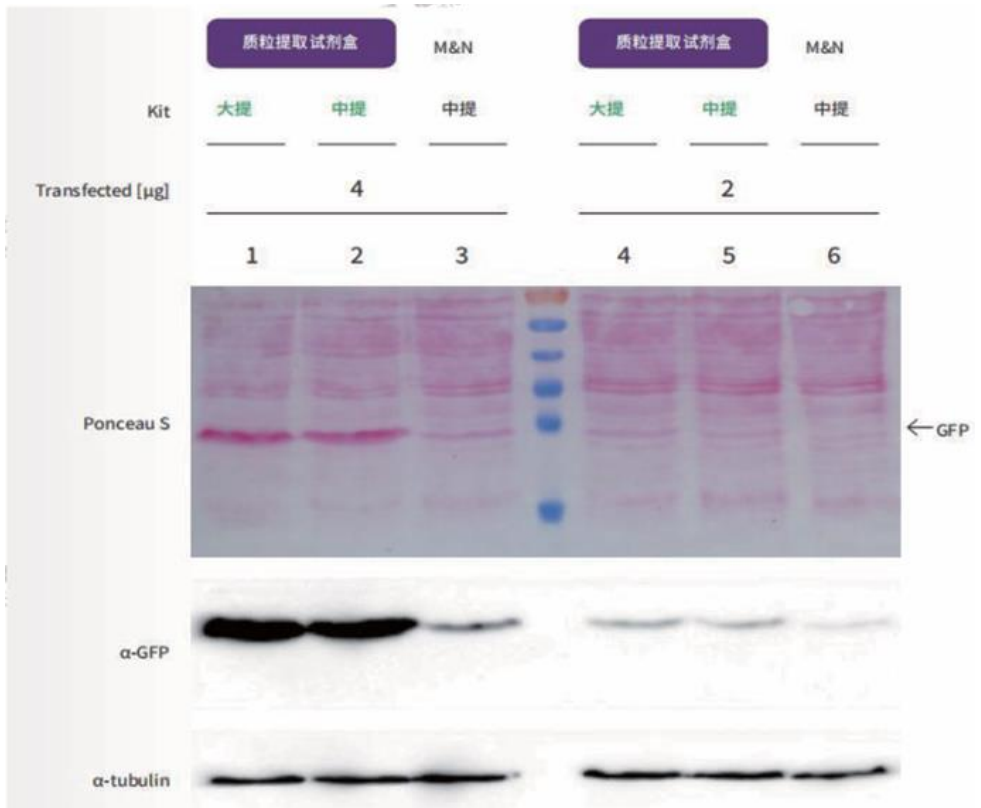
- ✧ 质粒DNA产量：可提取约1.2mg纯净的高拷贝DNA,提取率达到80%。
- ✧ DNA纯度：实验过程中不使用苯酚、氯仿等有毒性试剂，不使用乙醇沉淀，得到的质粒纯度高，一般情况Abs260/280 $\geq$ 1.8,Abs260/230 $\geq$ 2.0,内毒素含量小于0.1EU/ $\mu$ g，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染、体内细胞等各种敏感分子生物学实验。
- ✧ 质粒DNA大小：最高可达200kb。
- ✧ 洗脱体积： $\geq$ 800 $\mu$ l。
- ✧ 操作温度：室温（15-30 $^{\circ}$ C）。
- ✧ 操作时间：20分钟。
- ✧ 所需设备：微型离心机，真空泵&真空多连器（推荐）或摆动斗式离心机。
- ✧ 下图为：真空负压的简易流程图



## 产品描述：

零内毒素质粒大量提取试剂盒具有独特的核酸纯化柱设计，可以选择使用真空负压装置/离心机进行结合&洗涤步骤的处理，替代了缓慢的重力沉降法、酒精沉淀、长时间的內毒素去除孵育和耗时的离心，最快仅需要20分钟完成质粒大量提取全流程。洗脱出高浓度（高达6mg/ml）。质粒DNA是“无”（ $\leq$ 0.1EU/ $\mu$ g）内毒素的，并可适用于转染、重组病毒生产、慢病毒生产、基因组编辑、体内研究、测序、限制性内切酶消化、体外转录/翻译、PCR、转化等敏感应用。





使用简石生物-质粒纯化提取试剂盒制备的质粒DNA表现出优异的转染效率。使用简石生物-质粒纯化中量提取试剂盒、简石生物质粒纯化大量提取试剂盒或MN中量提取试剂盒，用从100ml细菌培养物中分离的2或4微克pCI-neo<sup>+</sup>GFP质粒转染接种在6孔板中的HeLa细胞。48小时后，使用蛋白质印迹和丽春红S染色在细胞裂解物中评估GFP表达蛋白。还用抗 $\alpha$ -微管蛋白的抗体对印迹进行了检测，以验证相同的加载样本。V.B.数据科隆大学。

## 溶液制备：

- ✧ 首次使用前，应将全部的RNaseA加入到P1中（终浓度 $\geq 100\mu\text{g/ml}$ ），添了RNaseA的P1最长可循2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存半年。如果溶液P1中RNaseA失活，提取的质粒可能会有微量RNA残留，循溶液P1中补加RNaseA即可。
- ✧ 试用装的质粒DNA洗涤液2请按照瓶体标注体积添加。
- ✧ 首次使用前，应添加88ml95%乙醇质粒DNA洗涤液2中。  
注：添加后应打勾标记，避免多次加入！

## 操作步骤:

1. 取150ml过夜培养的菌液, 约 $\geq 3,400 \times g$ 离心力下离心10分钟, 尽可能的弃尽上清, 收集菌体。
2. 用14ml溶液P1彻底重悬菌体沉淀, 可用吸头反复吹打或涡旋振荡至彻清悬浮。  
(如果有未彻清混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。)
3. 加14ml的溶液P2, 温和地上下翻转4-7次使菌体充分裂解, 室温放置2-3分钟。  
(温和地混合, 不要剧烈振荡, 以免基因组DNA剪切断裂! 所用时间不应超过5分钟! 以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠, 如果菌体少, 待快清亮粘稠后就可以做下一步。)
4. 加14ml溶液P3 (预冷), 立即温和地上下翻转4-7次, 中和完全后会出现黄色絮状沉淀。(中和完全后溶液完全呈现为黄色), 约 $\geq 3,400 \times g$ 离心力下离心5分钟。
5. 将一个50ml离心管放置在离心管架上准备收集过滤液, 然后把注射器下端的接头拧开并将上一步上清倒入注射器内, 将注射器推杆推入注射器内慢慢推动收集过滤液 (大约会收集到35ml左右的过滤液)。
6. 然后在过滤液中加入14ml质粒DNA结合液, 盖上盖子颠振10次左右使其混匀。

以下步骤可以通过真空负压的方式也可以通过离心的方式进行操作 (负压设备所用真空多连器推荐美国ZYMORESEARCH公司)

### 负压操作步骤

设备名称	真空多连器	缓冲瓶	真空泵 (耐腐蚀电泵)
图片			
设备货号	TS7000 (绿色真空多连器)	TIGM-0.5BF (缓冲瓶+真空泵)	
设备规格 (LxWxH) mm	尺寸: 442*123.5*126.2	尺寸: 350*130*215	
技术详情	最大容积: 3.35L 配件: 20x单向鲁尔开关	最大容积: 200ml	抽气速度: 30L/min 极限真空度: 50mbar

1. 将5号PX纯化柱 (连接15ml和50ml漏斗) 连接到负压真空多连器上, 倒入第6步的混合液, 打开真空开关使液体完全通过纯化柱。
2. 去掉50ml漏斗。

3. 关掉真空开关，倒入10ml质粒DNA洗涤液1到15ml漏斗内，打开真空开关，让液体完全通过纯化柱。
4. 关掉真空开关，倒入10ml质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入无水乙醇！）到15ml漏斗内，打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
5. 重复第4步。
6. 去掉15ml漏斗，将5号PX纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000\times g$ 条件下空转2分钟，以去除残留乙醇。
7. 将5号PX纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加600-800 $\mu$ l的质粒DNA洗脱液到柱基质上，（洗脱液事先在65-70 $^{\circ}$ C水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在 $\geq 10,000\times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。推荐：将洗脱后的DNA加回到柱基质上，进行二次洗脱可以提高产量。
8. 将内毒素去除柱的盖子拧开并将去除柱套在一个干净的收集管内。将上一步洗脱下来的质粒DNA全部加到去除柱内，室温下放置2分钟，在5,000 $\times g$ 的离心力下离心1分钟洗脱无内毒素的质粒DNA。将得到的质粒转移到1.5ml离心管保存或使用。

#### 离心操作步骤

1. 确认5号PX纯化柱（连接15ml漏斗）连接紧密后放置在一个50ml离心管里，倒入14ml第6步的混合液，500 $\times g$ 离心力下离心2分钟，倒掉离心管中的混合液，重复此步骤直到过滤液全部倒净。
2. 加入10ml质粒洗涤液1,500 $\times g$ 离心力下离心2分钟，弃掉废液。
3. 加入10ml质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入无水乙醇！），500 $\times g$ 离心力下离心2分钟，弃掉废液。
4. 重复第9步。
5. 去掉15ml漏斗，将5号PX纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000\times g$ 条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
6. 将5号PX纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加600-800 $\mu$ l的质粒DNA洗脱液到柱基质上，（洗脱液事先在65-70 $^{\circ}$ C水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在 $\geq 10,000\times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。推荐：将洗脱后的DNA加回到柱基质上，进行二次洗脱可以提高产量
7. 将内毒素去除柱的盖子拧开并将去除柱套在一个干净的收集管内。将上一步洗脱下来的质粒DNA全部加到去除柱内，室温下放置2分钟，在5,000 $\times g$ 的离心力下离心1分钟洗脱无内毒素的质粒DNA。将得到的质粒转移到1.5ml离心管保存或使用。  
得到的超纯质粒DNA可进行后续试验了！

## 简易流程图（真空负压法）

简易流程图	简述	常规操作说明	低拷贝数	从革兰氏阳性菌分离质粒DNA
处理菌液量		150ml	300ml	150ml
		在 $\geq 3,400 \times g$ 离心力下离心10分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体	丢弃上清液，湿重:1.50-2.70g	进行碱性裂解之前，必须用裂解酶消化细菌的细胞壁
	重悬	沉淀后的细菌细胞，加入14mlIP1中重悬		
	碱裂解	加入14mlIP2,温柔翻转4-7次，时长<5min		
	中和	加入14mlIP3,温柔翻转4-7次，出现沉淀，离心5min		
	过滤	将上述混合液倒入注射器套装过滤，底部50ml离心管收集过滤液		
	混合	加入14ml质粒DNA结合液，颠倒10次		
	结合	使用真空装置链接5号PX纯化柱套装，将上述混合液倒入5号PX纯化柱套装打开阀门		
	洗涤	去掉50ml漏斗，加入10ml质粒洗涤液1,加入10ml质粒洗涤液2,加入10ml质粒洗涤液2		
	洗脱	去掉15ml漏斗，将5号PX纯化柱套在2ml收集管中加入600-800 $\mu$ lDNA洗脱液离心		
	去内毒素	内毒素去除柱套在1.5ml离心管中洗脱下的质粒DNA，通过内毒素去除柱离心处理		



## 如何调整质粒结合液的体积：

调整出最适过滤液（通过注射器得到的过滤液）体积与质粒DNA结合液体积的比例在实验中是非常关键的。

因此，在方案的第5步中从注射器套装中回收大约35ml的过滤液非常重要。如果澄清后的过滤液体积低于约35ml,请在方案的第6步中调整质粒DNA结合液的用量。这可以通过将回收的裂解液体积乘以0.4来实现。请参考下面的示例和表格。

例如：对于31毫升的澄清后的裂解液，您需要在方案的第6步中向注射器过滤后的裂解液中添加12.4ml质粒DNA结合液，而不是14ml（ $31\text{ml} \times 0.4 = 12.4\text{ml}$ ）。

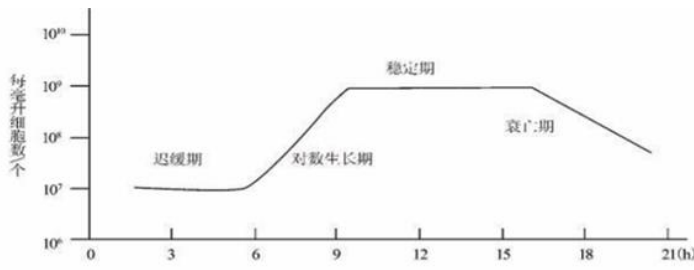
过滤液与质粒DNA结合液最佳比例体积如下表所示：

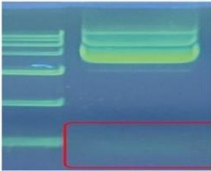
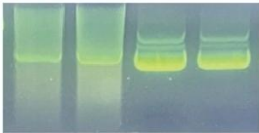
通过注射器过滤液的体积（简称：过滤液）	需要添加质粒DNA结合液的体积
35ml	14.0ml
34ml	13.6ml
33ml	13.2ml
32ml	12.8ml
31ml	12.4ml
30ml	12.0ml

### 过夜培养：

- ✧ 质粒纯化方案已经针对Luria-Bertani (LB) 培养基进行了优化。富含营养的培养基，如TerrificBroth或SuperBroth,可能会因细胞密度和质粒DNA拷贝数而导致性能降低和柱塞堵塞。因此，在使用富含营养的培养基时，有必要减少处理的培养物体积。
- ✧ 对于超过10ml的过夜培养体积，我们建议使用启动培养物以获得最佳生长。方法是将适当抗生素的10毫升或更少量的LB接种菌液用于平板上的菌落或甘油库存中，并在37°C下震荡培养8小时。8小时后，通过将启动培养物与适当抗生素的LB稀释1:500至1:1000来制备更大的过夜培养物。
- ✧ 培养容器的大小对过夜培养的适当通气也非常重要。最佳培养体积与空气体积比为1:5或更少（例如：使用250毫升烧瓶培养50毫升培养物）。为获得最佳通气效果，可以使用有挡板的培养烧瓶，并在培养容器上使用通气口或透气性封口，并以200-300rpm的速度摇动。

## FAQ常见问题及解决方法

Q,问题	A,可能的原因和建议的解决方案
<p>没有提取到质粒DNA或得率低</p>	<p>培养方面：溶氧量的问题，培养总体积不要过大，一般为培养瓶的20%体积，使用透气性好的封瓶膜，转数200rpm~250rpm。注意杂菌生长问题，菌落是否正常生长，抗生素不可忽略，培养基的PH=7.2,培养时间8~16H,温控在37°。</p>  <p>OD值对质粒提取至关重要：最佳性能提取及最佳吸光值，细胞数量保持OD值=3~5,可选择自然过夜培养的菌液，稀释十倍，或自行稀释最佳性能的OD值。</p> <p>菌量较多，不完全裂解：过多的细胞数会导致裂解及中和的不完全，直观表现为：①加P2后液相浑浊，不清澈透明；②加P3中和，离心后液相浑浊，中和不彻底，过滤注射器会堵塞。③加质粒结合液后液相浑浊，核酸结合柱会堵塞。影响得率以及浓度；（不同的菌种的生长条件，对碱性裂解敏感性有所不同，可适当调整裂解条件）</p> <p>不完全中和，P3的重要性：中和状态不应该是糊状及结团状，应该是蓬松，应是质地较轻漂浮到液面顶端，冰上孵育体系辅助中和，中和完全可有效去除基因组DNA,并提高得率,过得菌量并不能带来更多的质粒DNA并且会造成提取过程当中不必要的麻烦。P3加入后，中和离心后所剩液相体积与质粒结合液最佳比例体积。</p> <p>质粒DNA洗涤液2:确保在质粒洗涤液2中加入了正确体积的乙醇。此外，确保每次使用后瓶盖拧紧，以防止乙醇蒸发。</p>
<p>RNA的残留</p>	<p>过多的细胞数量会导致RNA残留过多，使得RNaseA的酶达到极值，不能消化掉更多的RNA残留。RNA残留过多影响核酸浓度值，使得数据不准确。解决办法为降低菌液量，严格按照标注的OD值进行操作或调高RNaseA的浓度（菌种本身RNA含量高）</p> <p>P1中的RNaseA降解，RNaseA溶解在P1后，确保P1长期存储在4℃,随用随取。如果确定溶液P1中的RNaseA失活，在溶液P1中补加RNaseA（终浓度≥100µg/ml）即可；RNaseA可以单独购买。</p>
<p>内毒素量超标</p>	<p>过多的细胞数量会导致内毒素过多，使得内毒素去除柱的能力达到极值，不能去除更多的内毒素量,解决办法为更换一个全新的内毒素去除柱重复过柱一次。</p>

质粒DNA电泳质量	a) 电泳点样孔异常亮：质粒中污染了细菌基因组DNA,多是由于P2加入后震荡过于剧烈，导致基因组DNA剪切或放置时间过长导致的	
	b) 质粒DNA条带下方500bp左右有条带或者荧光团的存在为RNA残留，需调整参与提取的菌液浓度，或者调整RNaseA的浓度；	
	电泳条带不完整，弥散，不干净 前两孔为杂菌DNA污染，裂解不充分，洗涤液性能衰退。 后两孔为正常质粒提取，浓度及纯度达到性能标准， 条带完整无基因组DNA和RNA污染，无降解。	

## 组件查询

组件名称	货号	规格	保存
RNaseA溶液	TE1008-0.6	600μl	4°C
	TE1008-1	1ml	
P1	TD4200-1-150	150ml	4°C
P2	TD4200-2-150	150ml	室温
P3	TD4200-3-150	150ml	室温
质粒DNA结合液	TD4200-4-150	150ml	室温
质粒DNA洗涤液1	TD4200-5-55	55ml	室温
质粒DNA洗涤液2（未添加乙醇）	TD4200-6-23	23ml	室温
质粒DNA洗脱液	TD4200-7-10	10ml	室温
	TD4200-7-20	20ml	
5号PX纯化柱+15ml漏斗X+50ml漏斗	TC1082-5	5个	室温
注射器内芯	TC1037-5	5个	室温
注射器外套（含滤网）	TC1092-5	5个	室温
3号内毒素去除柱	TC1051-10	10个	室温
2ml收集管	TC1001-20	20个	室温