无内毒素质粒小提中量试剂盒（磁珠法）使用说明书

【预期用途】

用于小量高纯度无内毒素质粒的提取。

【检验原理】

裂解含质粒的细菌，RNA 清除剂清除 RNA，基因组 DNA 被中和液沉淀而去除；内毒素被内毒素过滤柱和去内毒素缓冲液彻底去除；磁珠表面的硅胶高效吸附分离的质粒 DNA；洗涤磁珠，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶释放吸附质粒 DNA，从而达到快速分离纯化质粒 DNA 的目的。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	组成成分	50T	100T	200T
MDT-PuP03-C	细菌悬浮液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	120mL×1 瓶
	RNA 清除剂	600μL×1 支	1.2mL×1 支	2.4mL×1 瓶
	细菌裂解液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	120mL×1 瓶
	中和缓冲液 R	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	120mL×1 瓶
	去内毒素缓冲液	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	40mL×1 瓶
	内毒素过滤柱	50 支	100 支	200 支
	磁珠	1mL×1 支	2mL×1 支	4mL×1 瓶
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	24mL×2 瓶
	洗脱液 B	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

RNA 清除剂：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

其他试剂：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

细菌悬浮液：初次使用前加入全部 RNA 清除剂。短期使用 2-8℃保存，长期使用-20℃保存，有效期 1 年。

【注意事项】使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 使用前，细菌裂解液 37℃以上孵育至液体澄清（孵育需要 5-10 分钟）。
2. 使用前检查中和缓冲液 R 是否出现混浊或结晶，如有混浊或结晶，可于水浴中孵育至澄清。
3. 细菌悬浮液初次使用前加入全部 RNA 清除剂。
4. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60%会影响提取效果。
5. 提前配制 80%乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80%会影响提取效果。
6. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
7. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
8. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

含目的质粒的液体培养 12-16h 的菌液。

【适用范围】

5-15mL 菌液。

【提取得率】

质粒类型	质粒名称	菌液量	得率
低拷贝	pBR322，pACYC，pWE15，pSC101 等	5-15mL	8-30μg
高拷贝	pTZ，pUC，pBS 等	5-15mL	35-120μg

【自备器械和试剂】

高速离心机（最大离心力≥12,000×g，适配 5mL 离心管）、振荡恒温金属浴、磁力架、1.5mL 离心管、5mL 离心管、无水乙醇和异丙醇等。

- **RAW1 配制：**RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制：**1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。
- 试剂盒初次使用前，将 **RNA 清除剂**全部加入**细菌悬浮液**，混匀并做好标记后按规定保存。
- 每次使用前检查**细菌裂解液**和**中和缓冲液 R** 是否有沉淀或结晶，如有沉淀或结晶，请于 37°C 以上孵育至液体澄清（孵育需要 5-10 分钟）。

【操作步骤】

1. 取 5-15mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，12,000×g 离心 1 分钟。尽量吸除上清。多次离心的菌体沉淀可以合并至同一个 5mL 离心管中。

➢提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量。

➢菌液量以能够被细菌裂解液充分裂解为佳，菌液过多会因裂解不充分从而降低质粒的提取效率。

2. 向含菌体沉淀的 5mL 离心管中加入 600μL 细菌悬浮液，混匀沉淀。

➢如有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

3. 加入 600μL 细菌裂解液，温和的上下翻转 6-8 次，使液体充分混匀。室温放置 4 分钟，使菌体充分裂解。

➢混合时不要剧烈吹打，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。

➢室温放置时间不应超过 5 分钟，以免质粒受到破坏。

➢此时菌液应变得清亮粘稠，如果未清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量或按相同比例同时增加细菌悬浮液和细菌裂解液的使用量。

➢细菌裂解液在温度较低时容易产生沉淀，使用前充分孵育确保沉淀完全溶解。

4. 向 5mL 离心管中加入 600μL 中和缓冲液 R，立即温和地上下翻转 6-8 次，使液体充分混匀。室温（25-30℃）静置 10 分钟后，12,000×g，离心 10 分钟。此时在离心管底部形成白色沉淀。

➢中和缓冲液 R 加入后应立即轻轻颠倒混匀，避免产生局部沉淀。

➢细菌悬浮液和细菌裂解液增加时，中和液的量要相应增加。

➢离心时推荐使用 5mL 离心管，使用容积较小的离心管易导致上清中悬浮物较多，提取效率下降。

➢离心后的上清中如果还有悬浮物，可 12,000×g 再次离心 3 分钟。

➢室温太低易导致 RNA 清除不完全。

5. 将内毒素过滤柱放入收集管中，吸取 700μL 步骤 4 产生的上清转移至内毒素过滤柱中，闭盖 12,000×g 离心 1 分钟。取出内毒素过滤柱，转移收集管中的滤液至新的离心管中。

➢**尽量不要吸出沉淀。**

6. 重复第 5 步，至上清液完全过柱。弃去内毒素过滤柱，合并所有滤液至同一个离心管中。

7. 将滤液全部转移至 1.5mL 离心管，加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇和 0.1 倍滤液体积的去内毒素缓冲液和 20μL 磁珠，3,000rpm 振荡混匀 15 秒。

➢**加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染。**

➢**去内毒素缓冲液和磁珠使用前必须充分摇匀。**

8. 取出离心管，瞬时离心。将离心管放于 2mL 磁力架上，吸附磁珠至液体清澈。开盖，吸弃液体，保留磁珠。

9. 加入 600μL RAW1，闭盖。从磁力架上取下离心管，用移液器吹打混匀，使磁珠完全分散在洗液中。

10. 将离心管放回磁力架，吸附磁珠至液体清澈（**吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收**）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

11. 加入 600μL 80%乙醇水溶液，闭盖。从磁力架上取下离心管，用移液器吹打混匀，使磁珠完全分散在洗液中。

12. 将离心管放回 2mL 磁力架，吸附磁珠液体清澈（**吸附过程中颠倒磁力架数次，使离心管盖上残留的磁珠被充分回收**）。开盖，吸弃液体，保留磁珠（需吸干管底和管盖中的残留液体）。

13. 加入 600μL 无水乙醇。从磁力架上取下离心管，用移液器吹打混匀，使磁珠完全分散在洗液中。转移洗液中的磁珠至新的 1.5mL 离心管中。

➢**必须将无水乙醇中的磁珠转移至新的 1.5mL 离心管中，否则在 RNA 浓度测定时易引起 230 异常。**

14. 将离心管放入离心机，闭盖，瞬时离心 5 秒。

15. 将离心管放回 2mL 磁力架，吸附磁珠 30 秒，开盖，吸弃残留液体。

16. 将离心管放入金属浴，开盖，50℃烘干 1 分钟。闭盖，取出离心管。

➢样本较多时，必须闭盖，防止磁珠过干燥，影响提取效果。

17. 开盖，在离心管中加入 50μL 洗脱液 B，充分吹打混匀磁珠。闭盖，50℃ 1,500rpm 振荡 5 分钟。

➢洗脱液 B 的量可以根据需要调整，洗脱液必须完全覆盖磁珠。

➢洗脱液的使用量太少会影响提取效果。

➢洗脱液 B 可以根据下游实验需要更换。

18. 将离心管放入磁力架上，吸附磁珠 2 分钟至液体清澈。开盖，吸取洗脱液转移至新的 1.5mL 离心管中，-20℃保存备用。

➢洗脱液转移至新的离心管后，可以 12,000×g 离心 1 分钟，以彻底去除磁珠。

【质粒提取（柱式法）常见问题解答】

1.未提出质粒或质粒得率较低

⑴大肠杆菌老化：挑选平板培养 72 小时以内的单菌落重新进行液体培养。

⑵质粒拷贝数低：使用低拷贝数的载体时，增加菌体用量的同时需要增加相应试剂的使用量。

⑶菌体中无质粒：有些质粒频繁转接容易造成质粒丢失，因此每次接种时应接种单菌落；另外，使用的抗生素类型和浓度必须正确，否则易导致无质粒菌体优势生长。

⑷裂解不充分：菌体量使用过多易导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加相应试剂的用量。

⑸溶液使用不当：细菌裂解液和中和缓冲液在温度较低时可能出现浑浊或结晶，应置于 37℃以上孵育直至完全溶解。

⑹吸附柱过载：产品中吸附柱吸附质粒的能力有限，质粒提取量很大时，请分多次提取。若用富集培养基（如 SOC 或 SOB）或宿主菌生长率较高，则须减少菌液用量。

⑺洗脱不完全：洗脱时，适当加温（37-60℃）或延长洗脱时间，可提高质粒特别是大质粒的洗脱效率。

⑻乙醇残留：漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体。

⑼洗脱液 pH 值对洗脱的影响：洗脱效率与洗脱液的 pH 值有关，请确保洗脱液 pH>7.0，pH 过低可能导致洗脱量降低。

⑽洗脱体积对洗脱的影响：洗脱体积增大提取率增高，但质粒浓度降低。

⑾洗脱时间对洗脱的影响：洗脱时放置 1 分钟可达到较好的效果。如果是低拷贝质粒或质粒大于 8kb 时，可以分两次洗脱，并且对于大的质粒延长放置时间。

⑿洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面。

⒀溶液失效：细菌裂解液长期暴露在空气中容易失效，请每次使用完后，立即盖紧瓶塞，以免失效，造成碱裂解不充分。

2. 质粒纯度不高

⑴蛋白残留：菌体使用量过多时，减少菌体用量或增加试剂使用量。经细菌悬浮液，细菌裂解液和中和缓冲液处理，离心后的上清应为澄清的液体。离心后的上清中如果还有悬浮物，可颠倒数次后再次离心，使蛋白完全沉淀后再取上清至吸附柱中。

⑵RNA 残留：RNA 清除剂处理不彻底，减少菌体用量或加入中和缓冲液后室温再延长放置时间 5-10 分钟，或增加 RNA 清除剂的使用量。如果细菌悬浮液已保存 6 个月以上，请在细菌

悬浮液中添加新鲜的 RNA 清除剂。

⑶混有基因组 DNA：加入细菌裂解液后应温和混匀，如果剧烈振荡，可能把基因组 DNA 打断从而混杂在质粒中。如果加入细菌裂解液后过于粘稠，无法温和混匀，请减少菌体用量。细菌培养时间过长会导致细胞内 DNA 的降解，培养时间不要超过 16 小时。

⑷质粒的二聚体和多聚体形式：质粒复制过程中形成的，与宿主菌相关，电泳可检测出多条条带，单酶切处理后可变成单一条带。

【说明书编制日期】2024 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司

公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室

网　　址：www.wuxi-medtech.com

联系电话：173 1562 0564（刘经理）

Note.