# 无内毒素质粒大量提取试剂盒（柱式法）使用说明书

## 【预期用途】

用于大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彻底去除；吸附柱内的硅胶膜高效吸附分离的质粒 DNA；洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质；在洗脱液低盐高 pH 值的情况下，硅胶膜释放吸附质粒 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 | 5T | 10T |
|---|---|---|---|
| MDT-PuP01-L | 细菌悬浮液 | 40mL×1 瓶 | 80mL×1 瓶 |
| | RNA 清除剂 | 0.8mL×1 支 | 1.6mL×1 支 |
| | 细菌裂解液 | 40mL×1 瓶 | 80mL×1 瓶 |
| | 中和缓冲液 R | 40mL×1 瓶 | 80mL×1 瓶 |
| | 内毒素过滤柱 | 5 支 | 10 支 |
| | 吸附柱（含收集管） | 5 支 | 10 支 |
| | RAW1 缓冲液 | 24mL×1 瓶 | 24mL×2 瓶 |
| | 洗脱液 B | 10mL×1 瓶 | 20mL×1 瓶 |
| | 5M 氯化钠 | 500μL×1 支 | 1mL×1 支 |
| | 使用说明书 | 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，细菌裂解液如有沉淀则 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%会影响洗涤效果。
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】

高拷贝型质粒：100mL 菌液；低拷贝型质粒：200mL 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 | 200mL | 200-650μg |
| 高拷贝 | pTZ，pUC，pBS 等 | 100mL | 600-1500μg |

## 【自备器械和试剂】

大型高速离心机（最大离心力≥8,000rpm）、1.5mL 和 50mL 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）。

## 【标准操作步骤】

1. 取 100mL（低拷贝推荐用 200mL）过夜培养的菌液加入离心管中，10,000rpm 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. 向菌体沉淀的离心管中加入 8mL 细菌悬浮液，充分悬浮细菌沉淀。

**➢如有未充分混匀的菌块，会影响细菌裂解，导致质粒提取量和纯度偏低。**

3. 加入 8mL 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. 向离心管中加入 8mL 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℃）放置 10 分钟后，10,000rpm 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。**

**➢室温太低易导致 RNA 清除不完全。**

5. 将**“步骤 4”**产生的全部上清加入到内毒素过滤柱中，缓缓推动推柄将上清推入新的 50mL 离心管中。弃去内毒素过滤柱，保留离心管中的滤液。

**➢尽量不要吸出沉淀。**

6. 向离心管中的滤液加入 0.7 倍滤液体积的异丙醇，颠倒混匀。

**➢加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染。**

7. 将吸附柱放入 50mL 离心管中，转移 20mL**“步骤 6”**产生的混合液至吸附柱中，闭盖 10,000rpm 离心 1 分钟。弃去离心管中的废液，将吸附柱重新放入 50mL 离心管中。

8. 重复**“步骤 7”**，直至所有混合液完全过柱。

9. 开盖，在吸附柱中加入10mL RAW1，闭盖10,000rpm离心20秒。取出吸附柱，弃去离心管中的废液，将吸附柱重新放入50mL离心管中。

**➢加入 RAW1 时，避免 RAW1 接触吸附柱的管口。**

10.开盖，在吸附柱中加入10mL 80%乙醇水溶液，闭盖10,000rpm离心20秒。取出吸附柱，弃去离心管中的废液，将吸附柱重新放入50mL离心管中。

11. 开盖，在吸附柱中加入5mL 80%乙醇水溶液，闭盖10,000rpm离心20秒。取出吸附柱，弃去离心管中的废液，将吸附柱重新放入50mL离心管中。

12. 闭盖 10,000rpm 离心 3 分钟。取出吸附柱，弃掉离心管。

13. 将吸附柱放入新的 50mL 离心管中，加入 1-2mL 洗脱液 B 至吸附柱中心位置。闭盖室温静置 1 分钟，闭盖 10,000rpm 离心 1 分钟，收集洗脱液，-20℃保存备用。

**➢将离心后的洗脱液 B 重新加入吸附柱进行二次洗脱可以明显提高回收效率。**

**➢洗脱液 B 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成 TE 或 DEPC 水。**

**以下为质粒浓缩步骤（可选）**

14. 将洗脱液平均分配至 2-4 个 1.5 mL 离心管中。按每 0.5mL 洗脱液加入 0.35mL 异丙醇和 50μL 的 5M 氯化钠，颠倒混匀 50 次或直至产生浑浊。

**➢对于质粒浓度较低的样本，颠倒后还需-20℃放置 10 分钟以上才能产生浑浊。**

15. 12,000×g 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。

**➢有些离心机离心后沉淀并没有集中到试管底部，而是分散在试管壁上，因此可能看不到明显的沉淀。**

16. 在沉淀中加入 0.3mL 的 70%乙醇，充分悬浮沉淀沉淀，将沉淀合并至 1 个 1.5mL 离心管中。

**➢对于分散在试管壁上的沉淀，需要用尖嘴反复刮擦试管壁，使沉淀全部脱落至 70%的乙醇中。**

17. 闭盖，12,000×g 离心 30 秒，弃上清，保留沉淀。

18. 50℃，开盖干燥 5 分钟。干燥过程中再次吸弃残留液体。

19. 根据需要用适当体积的洗脱液 B 溶解沉淀，-20℃保存备用。

**➢洗脱液 B 的使用量可以根据需要调整。**

**➢洗脱液 B 可以根据下游实验需要更换成 TE 或 DEPC 水。**

**【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（微信同号）；　　138 6175 7779（微信同号）