

Code No. 9783S

研究用

TaKaRa

TaKaRa MidiBEST Endo-free
Plasmid Purification Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 使用前的准备事项	2
● 操作方法	2
● 使用例	3
● 注意事项	4
● Q&A	4

● 制品说明

本试剂盒是用于从培养细菌中提取各种无内毒素质粒 (plasmid、cosmid) 的中量纯化试剂盒。试剂盒采用了传统的 SDS 碱裂解法, 结合阴离子交换树脂和特殊的 buffer 组合, 可以有效去除内毒素, 具有高效、快速、方便之特点。使用本试剂盒可从 100 ml LB 培养基过夜培养菌液中纯化得到 200 μg 的高纯度无内毒素质粒 DNA ($OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$, 内毒素含量 <0.1 EU/μg)。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 溶解于 Endotoxin-free TE 或 Endotoxin-free H₂O 中, 纯度高, 可直接用于转化、转染、限制酶切等分子生物学实验。

● 制品内容 (10 次量)

本试剂盒分试剂 Set 与 Column Set 两部分。

■ 试剂 Set

RNase A (10 mg/ml)	0.88 ml
Buffer P1	88 ml
Buffer P2* ¹	88 ml
Buffer P3* ²	88 ml
Buffer PB	170 ml
Buffer PW1	400 ml
Buffer PW2	340 ml
Buffer PE	56 ml
Endo-free H ₂ O for 70% EtOH* ³	12 ml
Endo-free H ₂ O	12 ml
Endo-free TE	12 ml

*1 含有强碱溶液, 应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时, 请立即到医院进行处理。

*2 含有强变性剂, 应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时, 请立即到医院进行处理。

*3 首次使用前, 向 Endo-free H₂O for 70% EtOH 中添加 28 ml 的 100%乙醇。

■ Column Set

MidiEF DNA Column (包含预装的 Column Filter)	10 支
Plastic Washer*	5 枚

* Plastic Washer 请重复使用。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 无水乙醇
- ◆ 异丙醇

● 保存与运输

1. 本试剂盒可以在室温下 (15-25°C) 保存, 但温度较低时, 有的 Buffer 会出现沉淀, 使用前需 37°C 加热直至沉淀消失。
2. Buffer P1 中加入 RNase A 后可于 4°C 保存 6 个月。
3. RNase A 可于室温下 (15-25°C) 保存 6 个月, 长期保存需存放于 -20°C。
4. 本试剂盒于室温下 (15-25°C) 运输。

● 使用前的准备事项

1. 初次使用本试剂盒时，请将 RNase A 混浊液全部加入到 Buffer P1 中，均匀混合后 4℃ 保存，可稳定保存 6 个月。若 6 个月内不能全部使用完，建议不要全部混合，可依每次需要用量按照 Buffer P1:RNase A (10 mg/ml) = 100:1 的比例单独混合使用。
2. 首次使用前，向 Endo-free H₂O for 70% EtOH 中添加 28 ml 的 100%乙醇。
3. 检查 Buffer P2 和 Buffer P3 中是否有沉淀，如果有沉淀请将试剂置于 37℃ 温浴直至沉淀全部消失，不可剧烈振荡 Buffer P2，以免产生大量气泡。
4. Buffer P2 使用后，应立即盖紧盖子，避免试剂长时间与空气接触。
5. Buffer P3 使用前请于 4℃ 预冷。
6. 试剂中含有强碱及变性剂，操作时应佩戴手套等防护用具。
7. 提取过程中所使用的离心管、移液管、吸头须无热原或无内毒素，玻璃器皿须经 180℃ 过夜处理。

● 操作方法

确认 Buffer P1 中已经加入了 RNase A；Endo-free H₂O for 70% EtOH 中已经加入了无水乙醇。
实验操作前请将 Buffer P3 置于 4℃（或冰上）预冷后使用。

1. 菌体培养：
 - 1) 种培养：从平板培养基上挑选单菌落接种至 1~4 ml 的含有抗生素的液体培养基中，37℃ 培养 8 小时；
 - 2) 主培养：按照 1/1000 比例将种培养菌液接种于含有抗生素的液体培养基中（培养容器的容积应大于 4 倍培养液的体积），37℃ 过夜培养（12~16 小时）；
注）培养结束后，可使用小量提取试剂盒（如 Code No. 9760）提取质粒，以确认菌液是否正常。
2. 收集菌体：取适量过夜培养菌液于 50 ml 离心管中，6,000 × g，4℃ 离心 15 分钟，弃上清。
高拷贝质粒：建议取 25~100 ml 的过夜培养菌液；低拷贝质粒：建议取 100~200 ml 的过夜培养菌液。菌液超过 50 ml 时，需要分多次离心收集菌体于一个离心管中。
注）总菌体量 OD₆₀₀ 不宜超过 600，否则会影响质粒的纯度。
3. 用 8 ml 的 Buffer P1（含 RNase A）充分悬浮细菌沉淀。
注）注意不要残留细小菌块，可以使用振荡器（Vortex）剧烈振荡使菌体充分悬浮。
4. 加入 8 ml 的 Buffer P2 轻轻上下翻转混合 5~6 次，使菌体充分裂解，形成透明溶液。
注）轻轻颠倒混合，不可剧烈振荡，此步骤不宜超过 5 分钟。
5. 加入 8 ml 的 4℃ 预冷的 Buffer P3，轻轻上下翻转混合，直至形成紧实凝集块，然后冰上静置 5 分钟。
6. 离心：≥8,000 × g，4℃，离心 15 分钟。若离心后沉淀不紧实，可延长离心时间至 30 分钟。
7. 将试剂盒中的 MidiEF DNA Column 和 Plastic Washer 组装好，置于锥形瓶或 50 ml 离心管上，如图 1 所示。

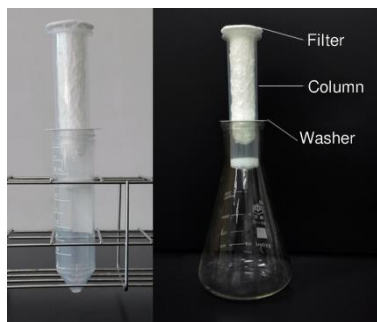


图 1 Column 组装示意图

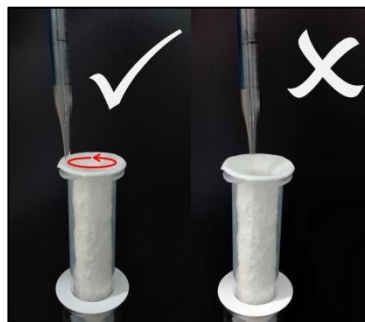


图 2 添加 buffer 操作示意图

8. 按照图 2 所示操作方法，向 Filter 上加入 15 ml Buffer PB，待溶液完全流出。
9. 将步骤 6 离心后的上清液倒入 MidiEF DNA Column 中，小心操作，避免倒入沉淀，待溶液完全流出后，移除 MidiEF DNA Column 中的 Filter（如图 3 所示）；

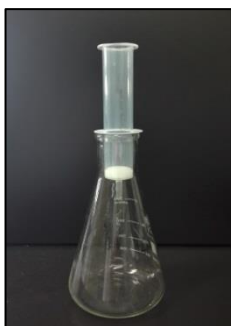


图 3 移除 Filter 后的 Column 示意图

10. 向 Column 中加入 35 ml Buffer PW1（加入前须确认已将 Filter 移除）；
11. 待上一步溶液完全流出后，向 Column 中加入 30 ml Buffer PW2；
12. 待上一步溶液完全流出后，将 Column 置于新的 15 ml 离心管上，向 Column 中加入 5 ml Buffer PE 洗脱质粒，收集洗脱液。

注) 将 Buffer PE 预热至 60°C 可以提高质粒收量。Plastic Washer 为重复使用材料，请回收用于下次使用。

13. 向步骤 12 的洗脱液中加入 0.7 倍体积异丙醇，充分振荡混匀， $\geq 8,000 \times g$ ，4°C 离心 30 分钟。
14. 小心移去步骤 13 上清液，向沉淀中加入 2 ml Endo-free 70% 乙醇，清洗沉淀， $\geq 8,000 \times g$ ，4°C 离心 15 分钟，小心弃上清，室温干燥 10 分钟。
15. 根据实验需要加入适量体积的 Endo-free H₂O 或 Endo-free TE 溶解沉淀。
16. 得到的质粒 DNA 于 -20°C 保存备用。

● 使用例

使用本试剂盒纯化 400 OD₆₀₀ 的 LB 培养基的菌液（菌株 *E. coli* JM109），得到约 200 μg 的质粒 DNA（OD₂₆₀/OD₂₈₀ ≥ 1.8 ），依据《中国药典》2015 年版四部通则 1143 “细菌内毒素检查法”凝胶法检测内毒素含量 < 0.1 EU/μg，此质粒为 pUC19，用 *Pst* I 酶切 1 小时（电泳结果见图 4）。

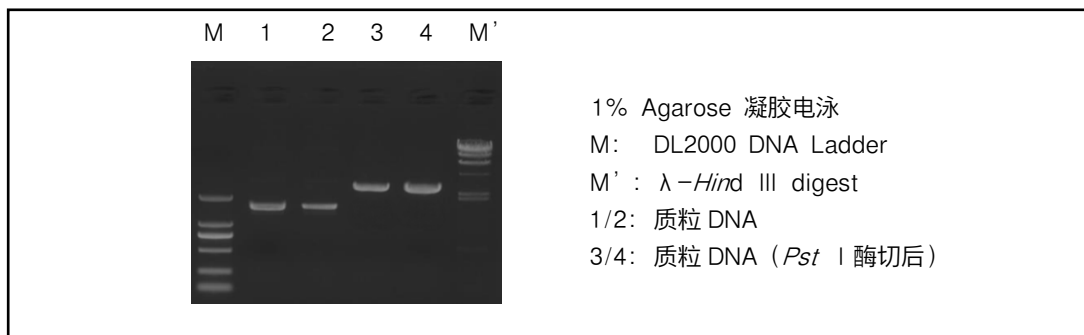


图 4 使用本试剂盒提取的 pUC19 质粒及酶切后电泳检测示例

● 注意事项

1. 每次起始的菌液量不应超过 200 ml 或总菌体量 OD₆₀₀ 不应超过 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。菌体的培养时间不要超过 16 小时，否则难以裂解。
2. 加入 Buffer P2 和 Buffer P3 后，不要剧烈混合（Vortex 等），剧烈混合会导致基因组 DNA 的污染。
3. 加入 Buffer P3 后，应充分混合，使蛋白质、基因组 DNA 等形成白色沉淀，离心后沉降于离心管底部。
4. 若离心后沉淀仍悬浮于溶液中时，请将离心管上下翻转混合数次后高速离心 3~5 分钟。
5. 纯化的质粒 DNA 用于 DNA 序列分析时，最好使用 Endotoxin-free H₂O 溶解质粒 DNA。
6. 质粒 DNA 需长期保存时，建议在 Endotoxin-free TE 中保存。

● Q&A

- Q1. 纯化质粒 DNA 时，一般使用多少菌体培养液比较合适？
- A1. 根据我们的经验，如为高拷贝质粒（如：pUC19 等），使用 100 ml 培养液，可以纯化得到约 200 μg 高纯度质粒 DNA。
- Q2. 本试剂盒对低拷贝质粒的纯化提取情况如何？
- A2. 对于低拷贝质粒，使用 100~200 ml 的菌体培养液进行质粒 DNA 的提取比较合适。如使用 pBR322 质粒时，从 100 ml 的菌体培养液中，可以纯化提取约 50 μg 的高纯度质粒 DNA。若质量量仍不够，可以多次提取后混合使用。
- Q3. 质粒 DNA 的收量较低，为什么？
- A3. 质粒 DNA 收量较低时，可以从以下几个方面考虑：
- ①. 大肠杆菌太陈旧（低温下长期保存的菌等）。请涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。
 - ②. 质粒拷贝数低。使用低拷贝数载体时，每次产出的质粒 DNA 量会降低。
 - ③. 确认操作过程的严密性。应严格按操作方法进行操作。
 - ④. 洗脱时将 Buffer PE 加热至 60°C 后使用有利于提高洗脱效率。
 - ⑤. 菌体量过多，裂解不充分，建议起始菌体量不得超过建议起始量。菌体量过多时，需要按照 0.02 ml/OD₆₀₀ 比例增加 Buffer P1/P2/P3 的加量，如菌体总量 OD₆₀₀=400 时，Buffer P1/P2/P3 的加量应为 400 OD₆₀₀*0.02 ml/OD₆₀₀=8 ml。
 - ⑥. 检查使用 buffer pH 是否改变，Buffer PW1 (pH6.3)、Buffer PW2 (pH7.0)、Buffer PE (pH9.5)，若上述 buffer pH 发生变化，可以使用 HCl 或 NaOH 进行 pH 调节。
- Q4. 裂解液 Buffer P1、Buffer P2、Buffer P3 不够用怎么办？
- A4. 裂解液 Buffer P1、Buffer P2、Buffer P3 可以使用如下溶液代替：
- ①. Solution I：25 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM EDTA (pH8.0)，100 μg/ml RNase A；
 - ②. Solution II：0.2 M NaOH、1% (w/v) SDS；
 - ③. Solution III：5 M 乙酸钾 60 ml、冰乙酸 11.5 ml、H₂O 28.5 ml，混合均匀后备用。
- 可参考《分子克隆实验指南》（第三版）附录 1 中碱裂解液 I、碱裂解液 II、碱性裂解液 III 配制方法。
- Q5. 加入 Buffer P2 后的溶菌液不澄清，为什么？
- A5. ① 菌体量过多，不能充分溶菌。使用本试剂盒时，每次可处理的菌体培养液为 25~200 ml，超过此范围时，应按比例增加裂解液的用量。
- ② 菌体沉淀悬浮不充分。在加入 Buffer P1 后，应使用振荡器（Vortex）等进行剧烈振荡使菌体沉淀充分悬浮后再做溶菌处理。
- Q6. 质粒 DNA 的最小溶解体积是多少？
- A6. 我们建议的溶解体积为 200~1000 μl，请根据需要选择。

Q7. 提取得到的质粒有基因组 DNA 污染，为什么？

- A7. ① 加入 Buffer P2 后所有的振荡要轻柔，不可剧烈；
② 加入 Buffer P2 后裂解时间不宜过长，不可超过 5 分钟；
③ 菌体培养时间不可过长，培养 12~16 小时为宜。

Q8. 提取得到的质粒有 RNA 污染，为什么？

- A8. ① 确保 Buffer P1 中已经加入了 RNase A；
② 加入 RNase A 的 Buffer P1 应于 4℃ 保存，若保存超过 3 个月，RNase A 活性会下降，可以重新再添加 RNase A (Code No. 2158)。

Q9. 质粒 DNA 纯度较低， $OD_{260}/OD_{280} < 1.8$ ，为什么？

A9. 可考虑以下几种原因：

- ①. 加入 Buffer P2 后操作时间过长，不得超过 5 分钟。
- ②. 确保第二次加入 Buffer PW1 (即操作步骤 10) 前已将 MidiEF DNA Column 中的 Filter 移除。
- ③. 确保 Buffer PW1、Buffer PW2 添加顺序和添加量正确。

Q10. 加入异丙醇或 70%乙醇，离心后没有形成沉淀，为什么？

A10. 可考虑以下几种原因：

- ①. 质粒 DNA 贴附于离心管壁，呈透明状，不容易观察到，此时溶解 DNA 时应旋转离心管，使溶解 buffer 充分接触管壁。
- ②. 确保异丙醇的添加量符合要求，即 0.7 倍体积。
- ③. 处理时应小心操作，弃上清时不要将沉淀丢失。
- ④. 必要时提高离心转速，增加离心时间。

Q11. 加入 Endo-free H₂O 或 Endo-free TE，沉淀不溶解，为什么？

A11. 可考虑以下几种原因及改善方法：

- ①. 沉淀干燥过度。可以尝试将样品置于 37℃ 条件下温浴 2 小时以改善溶解效果。
- ②. 沉淀中包含盐类或残留乙醇。使用 70%乙醇再次清洗，或增加溶解 buffer 的量。

Q12. 质粒内毒素含量较高 (>0.1 EU/ μ g)，为什么？

A12. 可考虑以下几种原因：

- ①. 菌体起始量过多，建议减少菌体起始量。
- ②. 确认 Buffer PW1、Buffer PW2 添加量及添加顺序是否正确。
- ③. 操作过程导致污染。确保操作中使用的离心管、移液管、玻璃器皿等器具满足无热原或无内毒素要求，确保使用的 70%乙醇及溶解质粒 DNA 的 buffer 未被污染。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>