

去内毒素超纯质粒小提试剂盒

说明书修改日期：2020.12.07

Cat number: KGA2050-KGA20100

Store at 2-8°C for 12 months

For Research Use Only(科研专用)

一、试剂盒说明

该试剂盒采用内毒素清除剂，经过3次处理可去除99%的内毒素，DNA损失小于20%。从根本上避免了内毒素对后续实验的影响。此外，本产品采用了一种新型的吸附材料，新吸附柱拥有良好的流速，超强的DNA结合能力和优秀的洗脱效率。改良的配方便试剂盒的菌液裂解能力，DNA与吸附柱的结合能力大大加强，新型裂解染料VisualLyse的加入让裂解过程变得可视，可控，实现质粒得率最大化。操作过程快速、方便，无需使用酚/氯仿抽提，无需乙醇沉淀，整个抽提过程约需要2个小时。由本试剂盒抽提得到的质粒纯度高，OD260/OD280比值一般为1.8-1.9之间，OD260/OD280比值大于2.0，可直接用于转化、DNA测序、PCR、基于PCR的突变、体外转录、酶切等后续实验。

二、试剂盒组份

组分	KGA2050 50次	KGA20100 100次	保存条件
纯化套件（吸附柱+收集管）	50套	100套	2-8°C 12 months
Buffer EBG	15ml	30ml	
Buffer P1	14ml	28ml	
Buffer P2	14ml	28ml	
Buffer MP3	10ml	20ml	
Buffer DW1	25ml	50ml	
Wash Solution	12ml	24ml	
Elution Buffer	5ml	10ml	
RNase A	210µl	420µl	
VisualLyse	60µl	120µl	
操作手册	一份	一份	

三、标准提取步骤

准备工作

自备材料：小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12000g$ ）、1.5ml Endotoxin-Free离心管、无水乙醇等。实验自备的试剂与耗材应无外源性内毒素污染。

试剂盒初次开启，取 RNase A全部加入Buffer P1中，吸打混匀后在瓶身做好标记，储存于2-8℃，有效期为六个月。

按瓶身标签说明在Wash Solution 中加入相应量的无水乙醇（乙醇终浓度为80%），混匀后在瓶身做好标记，于室温密闭保存。

BufferP2在低温下可能产生沉淀，使用前请检查，如有沉淀，请于37℃溶解，冷却至室温后使用。

准备水浴锅调节温度至65 。

将Buffer EBG置于冰上预冷。

1. 在合适抗生素的培养基中接种目标菌株，于 37℃摇床充分振荡培养 12-16h。
 - ✓ 菌液状态对质粒得率非常关键，请用不超过容器容量 1/4 体积的培养基进行培养。
 - ✓ 处于生长平台期的菌体用于质粒抽提得率最高，过度培养可能导致 DNA 降解。
2. 对于高拷贝质粒，取 1.5ml-3ml 菌液，于室温 4000 rpm 离心 1min，弃上清。
如取 3ml 菌液可分两次收集菌液，用移液器小心弃去上清，以免沉淀丢失。
3. 在菌体沉淀中加入 250µl Buffer P1，吸打或振荡至彻底悬浮菌体。
 - ✓ Buffer P1 首次使用时请检查是否已加入 Rnase A。
 - ✓ 一定要彻底悬浮菌体，否则影响得率和质量。
 - ✓ 如果使用 VisualLyse，则在加入 250µl Buffer P1 后再加入 1ul VisualLyse，振荡混匀。
 - ✓ VisualLyse 需在临用前加入，直接加入到 Buffer P1 中出现浑浊为正常现象。
4. 加入 250µl Buffer P2，立即温和颠倒离心管 5-10 次混匀，室温静置 2-4min。
 - ✓ 裂解时间与菌量相关，菌量多则适当延长时间，最长不能超过 5 分钟。
 - ✓ 质粒中量、大量提取混匀时一定要温和以免质粒 DNA 断裂。
 - ✓ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法，计时从第一管样品加入开始。
 - ✓ 如果使用了 VisualLyse，则溶液呈现均匀的蓝色表示混匀良好，如果出现白色团块，则提示菌体可能过量，宜选用更少的菌液重新开始。
5. 加入 125µl Buffer MP3，立即温和颠倒离心管 5-10 次充分混匀。
 - ✓ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法。加入 Buffer MP3 后，离心管中会立即出现大量白色絮状沉淀。如果使用了 VisualLyse，则溶液由蓝色重新变为无色，有蓝色残留表示混匀不彻底，继续混合至蓝色全部消失。
 - ✓ 如果起始菌液较多，混匀后室温静置 2 分钟以彻底去除 RNA。
6. 于离心机 12000xg 离心 10min，将上清全部小心移入一个新的1.5ml离心管中，上清体积大约为 500-550µl。
7. 加入0.1倍的Buffer EBG，至上清中，颠倒混匀。
 - ✓ 如果上清为500µl，则加入50µl Buffer EBG。
8. 冰浴10min，期间颠倒混匀3-5次。
 - ✓ 加入Buffer EBG后溶液变浑浊，冰浴后溶液变澄清。
9. 65 水浴直到溶液变浑浊或出现分层为止（一般需要1-5min）。
10. 于离心机12000xg室温离心3min，转移无色透明的上层水相至一干净的1.5ml离心管中。
 - ✓ 不能低温离心，离心后上层为无色透明，下层为淡蓝色。
 - ✓ 使用Buffer EBG处理一次大概可以去掉质粒上清当中90%的内毒素。
 - ✓ 如对内毒素含量有更高要求，可以重复步骤7-10，使用Buffer EBG处理三次可以去除，但是质粒也会损失20%左右。
11. 加入0.5倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀6-7次，室温放置2min。
12. 将上述混匀的溶液全部小心移入吸附柱，9000xg离心30秒，倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
 - ✓ 吸附柱的最大有效容积为750µl，若溶液较多，可以重复该步骤直至所有溶液流过吸附柱。
13. （可选步骤）在吸附柱中加入 500µl Buffer DW1, 9000×g 离心 30sec，倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
 - ✓ 对于 End A+宿主菌，如 BL21,HB101,JM 系列等，此步不能省略。
 - ✓ 对于 End A+宿主菌，如 DH5 α ,TOP10D 等，此步可以省略，但进行该步骤将进一步降低蛋白残留量。

14. 向吸附柱中加入500 μ l Wash Buffer, 9000 \times g离心30秒, 倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

✓ Wash Buffer首次使用前请检查是否已加入正确量的无水乙醇。

15. 重复步骤14一次。

16. 将孔吸附柱和收集管放入离心机, 9000 \times g离心1min。

✓ 此步绝不可省略, 否则参与的乙醇会严重影响得率和后续实验。

17. 将吸附柱放入一干净的1.5ml离心管中, 开盖室温防止2-3min。

18. 在吸附膜中央加入 50 μ l-100 μ l Elution Buffer, 室温静置 1-2min, 9000 \times g 离心 1min, 将所得到的质粒 DNA 溶液置于-20 $^{\circ}$ C保存或用于后续实验。

✓ Elution Buffer 为 2.5mM Tris-HCl, Ph 8.5, 可以用无内毒素水 (Ph > 7.0) 代替。

✓ 将 Elution Buffer 预热至 60 $^{\circ}$ C可以进一步提高得率。

✓ 如果质粒 >8kb, 加入 Elution Buffer 后, 在 37-60 $^{\circ}$ C温浴 2 分钟可以显著提高得率。

✓ 质粒小量抽提, 使用小于 40 μ l 的洗脱液可以得到浓度更高的 DNA, 但得率显著降低。

四、保存方法及注意事项

试剂盒于常温运输, 未开启的试剂盒可以于室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 保存, 有效期见包装。加入 RNase A 后, Buffer P1 请存放于 2-8 $^{\circ}$ C, 有效期为半年。Buffer EBG 长期存放请置于 2-8 $^{\circ}$ C。

Buffer MP3 和 Buffer DW1 中含有刺激性的化合物, 操作过程中应穿上实验服, 戴好乳胶手套, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 防止吸入口鼻。沾染皮肤或眼睛后, 请立即用清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医生的帮助。