

无内毒素质粒 DNA 小提中量试剂盒

一、产品简介

本试剂盒采用 SDS/碱裂解法释放质粒 DNA, 选择性吸附质粒 DNA 去除绝大部分内毒素, 高盐离子洗脱, 进一步分相去除残留的内毒素, 异丙醇沉淀回收质粒 DNA, 可根据实验需要决定 DNA 溶解体积。以平行处理 4 个样品为例, 操作时间约 100 min。

处理菌液体积与产量: 5-15 ml LB 菌液, 每毫升 LB 菌液中可获得 5-10 µg 高拷贝质粒 DNA。

质量与应用: 内毒素含量低于 6 EU/mg 质粒 DNA, 以超螺旋构型为主, 无 RNA 与基因组 DNA 残留, 可用于细胞转染。

相关产品:

无内毒素质粒 DNA 小量提取试剂盒(DK311), 适合从 1-5 ml LB 菌液中提取质粒 DNA。

无内毒素质粒 DNA 大量提试剂盒(DK313), 适合从 100-200 ml LB 菌液中提取高拷贝质粒 DNA 或 200-400 ml LB 菌液中提取低拷贝质粒。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK312-01(50 次)	原理与用途
RNase A1*	400µl	降解 RNA
Buffer PS	60 ml	用于转移细菌, 请勿添加 RNase
Buffer EP1	15 ml	添加 RNase, 悬浮细菌
Buffer EP2	30 ml	含 SDS/NaOH, 裂解细菌
Buffer EP3	30 ml	中和液, 去除蛋白和基因组 DNA
过滤柱-LP	50 个	过滤去除悬浮颗粒
Buffer EP4	15 ml	调整 DNA 结合条件
DNA 吸附柱-E2	50 个	选择性吸附 DNA, 去除绝大部分内毒素
收集管	50 个×2	接收废液
Buffer EP5	60 ml	漂洗去除内毒素, <600 EU/mg DNA
2 ml 离心管	50 个	接收洗脱的 DNA
Buffer EPA	20 ml	洗脱 DNA, 可估测质粒 DNA 总量
Buffer EPB	10 ml	洗脱 DNA
Buffer EPC	35 ml	促使溶液分相, 去除残留的内毒素, <6 EU/mg DNA
Buffer WE [§]	40 ml	加入乙醇后为 70%乙醇溶液, 洗涤去盐
1.5 ml 离心管	50 个×3	无热源
无内毒素水*	15 ml	内毒素含量<0.06 EU/ml, 溶解质粒
说明书	1 份	

*RNase A1: 50 mg/ml, -20℃长期保存; 第一次使用前将RNase A1全部加入指定的Buffer EP1中, 2-8℃保存。

[§]Buffer WE, 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无热源无水乙醇, 混合均匀。

*无内毒素水: 不含防腐剂, 建议开盖后分装, 2-8℃保存或-20℃冻存。

三、注意事项

- 1.Buffer EP2、Buffer EP3、Buffer EP4、Buffer EP5、Buffer EPB 和 Buffer EPC 含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果。

四、实验原理与相关注意事项

(一) 细菌培养、收集与悬浮——步骤 1-2

建议从新鲜的平板（一周内涂板或划线）挑取单克隆，LB 培养基过夜培养（12-16 小时），体积不超过培养容器的 1/3，例如使用 50 ml 试管培养体积不超过 15 ml。使用高丰富培养基通常能获得更高的菌密度，需减少处理体积；同时会增加蛋白与代谢物的比例不利于质粒 DNA 提取。

为方便操作，建议使用 10-50 ml 离心管收集，加 1 ml Buffer PS（勿添加 RNase）悬浮细菌，转入 1.5-2 ml 离心管，再次离心去除上清。需尽可能去除离心上清，建议简短离心仔细吸除。大量溶液残留会稀释后续溶液盐离子浓度，影响 DNA 结合条件。

步骤 2 需充分悬浮细菌，不然会影响裂解并造成基因组 DNA 残留；建议使用枪头反复吹打，将悬浮液完全吸入枪头检查离心管壁是否有菌块残留。

(二) SDS/碱裂解、中和与过滤——步骤 3-5

Buffer EP2 含 SDS 和 NaOH，此时基因组 DNA 部分变性为单链，应缓慢摇晃避免机械力打断基因组 DNA。

Buffer EP3 中和碱性环境，K⁺置换 SDS(钠盐)为水溶性差的 KDS(钾盐)，促使蛋白质、细菌碎片和基因组 DNA 相互缠绕成大型复合物。优化的溶液环境能迅速完成此过程，此步骤可剧烈摇晃。剧烈摇晃可分散大型复合物，释放其中包裹的溶液，有利于充分中和、释放质粒 DNA。

后续室温放置 30 min 有利于 RNase 充分降解 RNA，延长放置时间不影响实验效果。

离心后通常有碎片漂浮或悬浮于溶液，需过滤去除。预过滤柱-LP 填装大孔径过滤材质，溶液可自然滤过；请勿离心，不然颗粒物会穿透过滤材质。

(三) 选择性吸附 DNA——步骤 6

Buffer EP4 将溶液环境调整至最佳结合条件：保证 DNA 吸附效率的同时，最大程度使内毒素与其他杂质穿透滤过。

Buffer EP4 与滤液最佳比例为 2/9，因此步骤 1 需尽可能去除离心上清，不然会影响滤液体积；步骤 5 如转移过程损失大量溶液，需估测滤液体积。

DNA 吸附柱中填装的材质较松软，需低速(3,000×g)离心。高速离心会使填装的材质变形，影响 DNA 吸附效率。

(四) 漂洗去除内毒素——步骤 7

洗涤去除 DNA 吸附柱中残留的溶液，漂洗后内毒素残留<600 EU/mg DNA。

后续步骤需避免外源内毒素（热源）污染：试剂盒提供的试剂与耗材均为无热源，用户需使用无热源枪头。

(五) 洗脱 DNA——步骤 8

试剂盒提供的 2 ml 离心管与 DNA 吸附柱匹配，请按 page4-3 图示组装。

Buffer EPA 洗脱后可用紫外分光光度计检测核酸浓度，估算总 DNA 量，用以决定最终溶解体积。Buffer EPA 为弱碱性高浓度钠盐，不会腐蚀仪器。

Buffer EPB 洗脱后溶液呈浑浊状，其浑浊程度与质粒 DNA 量成正相关。

(六) 分相去除内毒素——步骤 9

Buffer EPC 与洗脱液混合后呈白色乳浊状，室温放置 5 min 有利于内毒素与质粒 DNA 分离。

离心后溶液分相：上层为含质粒 DNA 的水相，下层为含内毒素的油脂相。将移液器刻度调为 700 μl，接近下相时应缓慢吸取，避免吸取下相。如不小心吸取了下相，将溶液转移至干净的 1.5 ml 离心管(试剂盒携带)，离心 1 min，重新吸取上相。

再次加入 Buffer EPC 分相彻底去除内毒素，此时内毒素残留<6 EU/mg DNA。

(七) 沉淀 DNA 与洗涤——步骤 10-11

异丙醇沉淀回收质粒 DNA，建议使用新开瓶的异丙醇，避免外源内毒素污染。

倒弃上清时离心管口勿接触废液缸，勿将离心管在吸水纸上倒扣，避免外源内毒素污染。

Buffer WE 添加乙醇后为 70%乙醇溶液，建议使用新开瓶的乙醇，避免外源内毒素污染。

Buffer WE 洗涤后 DNA 沉淀物贴壁性差，很容易从管底脱落，倒弃上清时应注意观察沉淀物位置。如沉淀物脱落，建议使用枪头吸除溶液。

保持离心管开盖，室温放置 10 min 挥发残留的乙醇，避免长时间放置过度干燥 DNA。

(八) 溶解——步骤 12

试剂盒提供无内毒素水，内毒素含量<0.06 EU/ml，不含防腐剂，不影响细胞培养，溶解的质粒 DNA 可直接用于转染。建议试剂瓶开盖后分装至无热源离心管，低温保存。用户也可以使用自备的溶液溶解 DNA。

可根据 Buffer EPA 洗脱后估算的总 DNA 量和实验需要的浓度决定溶解体积；通常使用 1/200 菌液体积作为溶解体积，质粒 DNA 浓度为 1-2 μg/μl。

使沉淀物脱管底能明显加快溶解速度，通常按步骤 12 操作 10-20 min 即可完全溶解 DNA。

建议检测浓度后轻弹离心管底部再次检测浓度，如浓度无明显变化说明 DNA 已溶解完全，如浓度明显升高说明 DNA 未溶解完全，需延长溶解时间。

五、实验准备

1. 第一次使用前，将试剂盒携带的 RNase A1 全部加入指定的 Buffer EP1 试剂瓶。
2. 第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WE 中加入无热源无水乙醇，混合均匀。
3. 每次使用前，检查 Buffer EP2 是否析出白色或者晶体状沉淀，如有沉淀在 37℃ 放置数分钟，沉淀溶解后恢复至室温(约 20min)后使用。
4. 每次使用前，检查 Buffer EP3 是否析晶体状沉淀，如有沉淀在 55-80℃ 放置数分钟，沉淀溶解后置于冰水浴中降温后使用。
通常析出的沉淀物加热溶解后 3 个月内不会再析出。
5. 无热源异丙醇。

六、操作步骤（如未注明，所有离心参数为台式快速离心机，室温 12,000×g）

1. 离心收集细菌：

将 5-15 ml 菌液置于 10-50 ml 离心管（自备），3,000×g 离心 5 min，倒弃上清；
加入 1 ml Buffer PS（勿添加 RNase）悬浮细菌，转入干净的 1.5-2 ml 离心管（自备），离心 30 秒，弃尽上清。

2. 悬浮细菌：

加入 **250 μl Buffer EP1**（请确认已加入 RNase A1），Vortex 震荡或用枪头吹打充分悬浮细菌，直至无可见的菌块。

3. 裂解：

加入 **500 μl Buffer EP2**，缓慢翻转离心管 10-20 次，直至溶液呈浅黄色透亮状或呈均一的浑浊液。

4. 中和：

加入 **500 μl Buffer EP3**，剧烈摇晃 10 次，室温放置 30 min，离心 10 min。

5. 过滤去除悬浮物：

将溶液转入**预过滤柱-LP**(置于 2 ml 离心管)，室温放置 1 min，使溶液自然滤过，丢弃预过滤柱-LP-----! 请勿离心
! 通常滤液体积为 1-1.15 ml，如转移过程损失大量溶液，需估测滤液体积，操作步骤 6 中 Buffer EP4 用量为滤液体积的 2/9

6. 选择性吸附 DNA-----! 请勿高速离心

加入 **250 μl Buffer EP4**，缓慢翻转 1-2 次或吹打 2 次，吸取 800 μl 溶液转入 **DNA 吸附柱-E2**(置于收集管)，3,000×g 离心 10 秒，倒弃废液；
将剩余的溶液转入 DNA 吸附柱-E2，3,000×g 离心 10 秒，将 DNA 吸附柱-E2 转入另一个干净的收集管中。

7. 漂洗去除杂质：

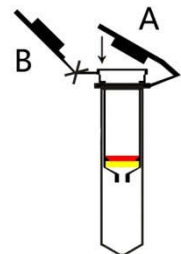
加入 **600 μl Buffer EP5**，离心 10 秒，弃废液，将 DNA 吸附柱-E2 放回收集管中；
加入 **300 μl Buffer EP5**，离心 1 min。

8. 洗脱 DNA-----! 此步骤开始需避免外源内毒素污染

将 DNA 吸附柱-E2 转入 2 ml 离心管（试剂盒携带），加入 **150 μl Buffer EPA**，将 2 ml 离心管盖(A)扣在 DNA 吸附柱上，做好标记，去除 DNA 吸附柱的盖子(B)，离心 10 秒；

加入 **150 μl Buffer EPA**，室温放置 1 min，离心 10 秒-----可将洗脱液混合均匀后检测浓度

加入 **150 μl Buffer EPB**，室温放置 1 min，离心 1 min，丢弃 DNA 吸附柱-E2。



9. 分相去除残留的内毒素：

加入 **450 μl Buffer EPC**，用力摇晃 10 次，室温放置 5 min，离心 2 min；仔细吸取 700 μl 上相，转入干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒携带）。

! 如不小心吸取了上相，可在转管后离心 1 min，重新吸取上相。

加入 **150 μl Buffer EPC**；用力摇晃 10 次，离心 2 min；仔细吸取 725 μl 上相，转入另一个干净的 1.5 ml 离心管（试剂盒携带）。

! 如不小心吸取了上相，可在转管后离心 1 min，重新吸取上相。

10. 沉淀质粒 DNA:

加入 **600 μ l 异丙醇**, 用力摇晃 10 次, 离心 10 min, 倒弃上清-----! 离心管口勿接触废液缸, 勿将离心管在吸水纸上倒扣

11. 漂洗去除盐:

加入 **1 ml Buffer WE**(第一次使用前加入无水乙醇), 离心 1 min, 缓慢倒弃上清-----! 沉淀物易滑落, 请勿倒弃

加入 **1 ml Buffer WE**, 离心 1 min, 缓慢倒弃上清-----! 沉淀物易滑落, 请勿倒弃

简短离心, 仔细吸除残留的溶液, 保持离心管开盖, 室温放置 10 min 挥发残留的乙醇。

12. 溶解质粒 DNA:

根据实验需要加入无内毒素水或自备的溶液, 通常 25-100 μ l;

Vortex 或轻弹离心管底部使沉淀物脱离管底, 室温放置 5-10 min, 以同样的方式再次处理, 室温放置 5-10 min。

附 1. 分光光度计检测

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 其 A260/A230 比值通常为 2.2-2.4, 说明无明显的蛋白和盐残留; A260/A280 比值通常为 1.8-1.83, 说明无明显的 RNA 残留。

核酸浓度高于 680 ng/ μ l 时, A260/A280 比值明显偏高, 不代表 DNA 降解、变性或 RNA 残留, 建议稀释后检测浓度。

附 2. 电泳检测

建议使用 0.5-0.8% 琼脂糖凝胶 5-7 V/cm 电泳, 更高浓度凝胶会使质粒 DNA 构型发生变化。

建议电泳 5 min 后紫外成像观察有无 RNA 残留, 长时间电泳后 RNA 迁移至无 EB 区无法观察到;

继续电泳 15-20 min 观察质粒构型与基因组 DNA 残留情况。

附 3: 鲎试剂凝胶法检测内毒素

规格: 0.1 ml 灵敏度: 0.06 EU/ml 检测下限: 0.006 EU/支 (购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司)

检测组	37°C 正立放置 1 小时, 观察凝胶形态
1. 阴性对照: 100 μ l 无内毒素水	液态: 材料与操作过程无内毒素污染 固态: 材料或操作过程有内毒素污染, 所有实验数据无效
2. 阳性对照: 用无内毒素水配制标准品至 0.25 λ (0.06 EU/ml), 100 μ l	液态: 鲎试剂失效, 所有实验数据无效 固态: 鲎试剂有效, 达到预期灵敏度
3. 干扰测试: 1-2 μ g 质粒 DNA 与 0.25 λ 标准品混合, 100 μ l	液态: 鲎试剂失效或检测样品干扰凝胶反应, 所有实验数据无效 固态: 检测样品不影响凝胶反应
4. 检测样品: 1-2 μ g 质粒 DNA 加无内毒素水至 100 μ l	液态: 内毒素含量 < 0.006 EU/ μ g DNA (6 EU/mg DNA) 固态: 内毒素含量 > 0.006 EU/ μ g DNA (6 EU/mg DNA)

通常使用本试剂盒提取的质粒 DNA 检测量为 1-4 μ g, 无凝集反应。