

## 无内毒素质粒 DNA 大量提取试剂盒

### 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。

DNA 吸附柱-扩容管在负压装置上完成吸附 DNA 过程, 实现了大体积溶液转小管操作, 即后续步骤使用 1.5-2 ml 离心管操作; 以平行处理 4 个样品为例, 操作时间约 150 min。

处理菌液体积与产量: 100-200 ml 含高拷贝质粒的 LB 菌液, 产量为 1-2 mg 质粒 DNA。

200-400 ml 含低拷贝质粒的 LB 菌液, 产量 50-200 µg 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, 可用于细胞转染与 DNA 疫苗。

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 小提中量试剂盒(DK312), 适合从 5-15 ml LB 菌液中提取质粒 DNA。

负压抽滤系统:

真空泵: 建议购买 AP-02B 型无油真空/压力泵, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司

负压装置: 建议购买 AxyVac II 负压装置, Axygen

### 二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK313-01(4 次)	DK314-02(20 次)	原理与用途
Buffer PS	60 ml	250 ml	合并细菌、悬浮细菌, 请勿添加 RNase,
Buffer EP2	50 ml	250 ml	含 SDS/NaOH, 裂解细菌
Buffer EP3	50 ml	250 ml	中和液, 去除蛋白和基因组 DNA
RNase A1*	200µl	1 ml	降解 RNA
过滤柱-MP	4 套	10 套×2	过滤去除悬浮颗粒
Buffer EP4	25 ml	125 ml	调整 DNA 结合条件
DNA 吸附柱-E3	4 个	20 个	选择性吸附 DNA, 去除绝大部分内毒素
收集管	8 个	50 个	接收废液
接头	4 个	20 个	连接 DNA 吸附柱至负压装置, 防止交叉污染
30ml-扩容管	4 个	10 个×2	连接至 DNA 吸附柱, 增加过柱体积
Buffer EP5	5 ml	25 ml	漂洗去除内毒素, <600 EU/mg DNA
2 ml 离心管	4 个	20 个	接收洗脱的 DNA
Buffer EPA	2 ml	12 ml	洗脱 DNA, 可估测质粒 DNA 总量
Buffer EPB	1.5 ml	6 ml	洗脱 DNA
Buffer EPC	4 ml	20 ml	促使溶液分相, 去除残留的内毒素, <6 EU/mg DNA
Buffer WE <sup>§</sup>	10ml(已加入乙醇)	20 ml	加入乙醇后为 70%乙醇溶液, 洗涤去盐
1.5 ml 离心管	12 个	60 个	无热源
无内毒素水*	15 ml	60 ml	内毒素含量<0.06 EU/ml, 溶解质粒
说明书	1 份	1 份	

\*RNase A1: 50 mg/ml, -20℃长期保存, 如频繁使用可2-8℃保存; 请勿加入Buffer PS中。

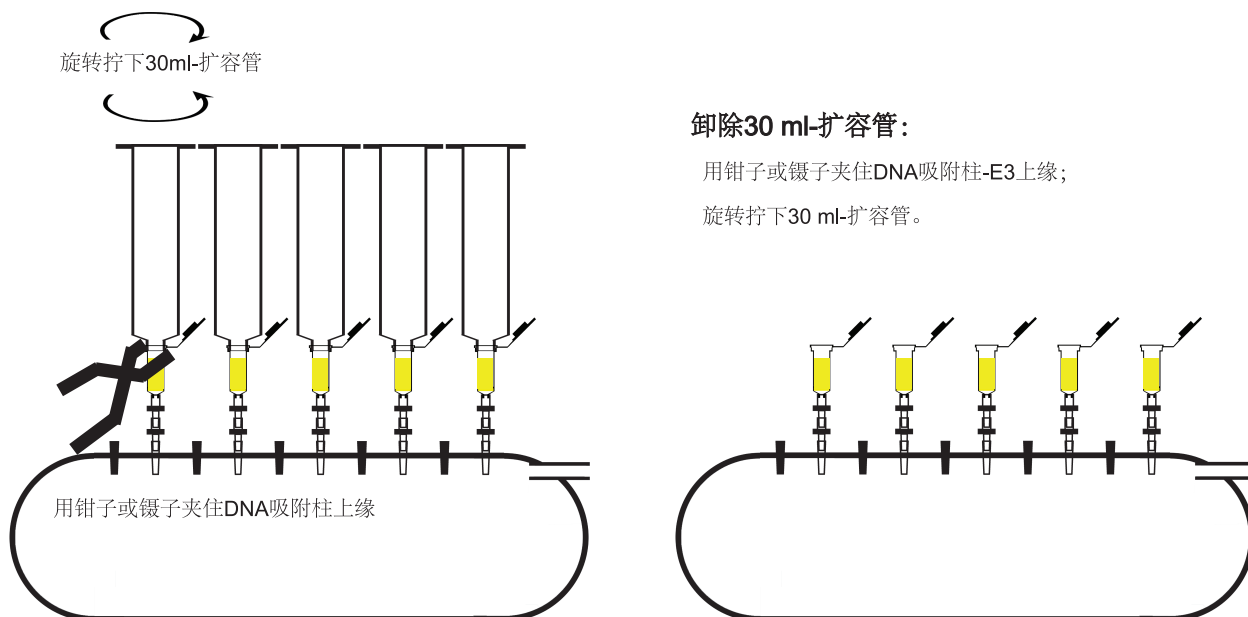
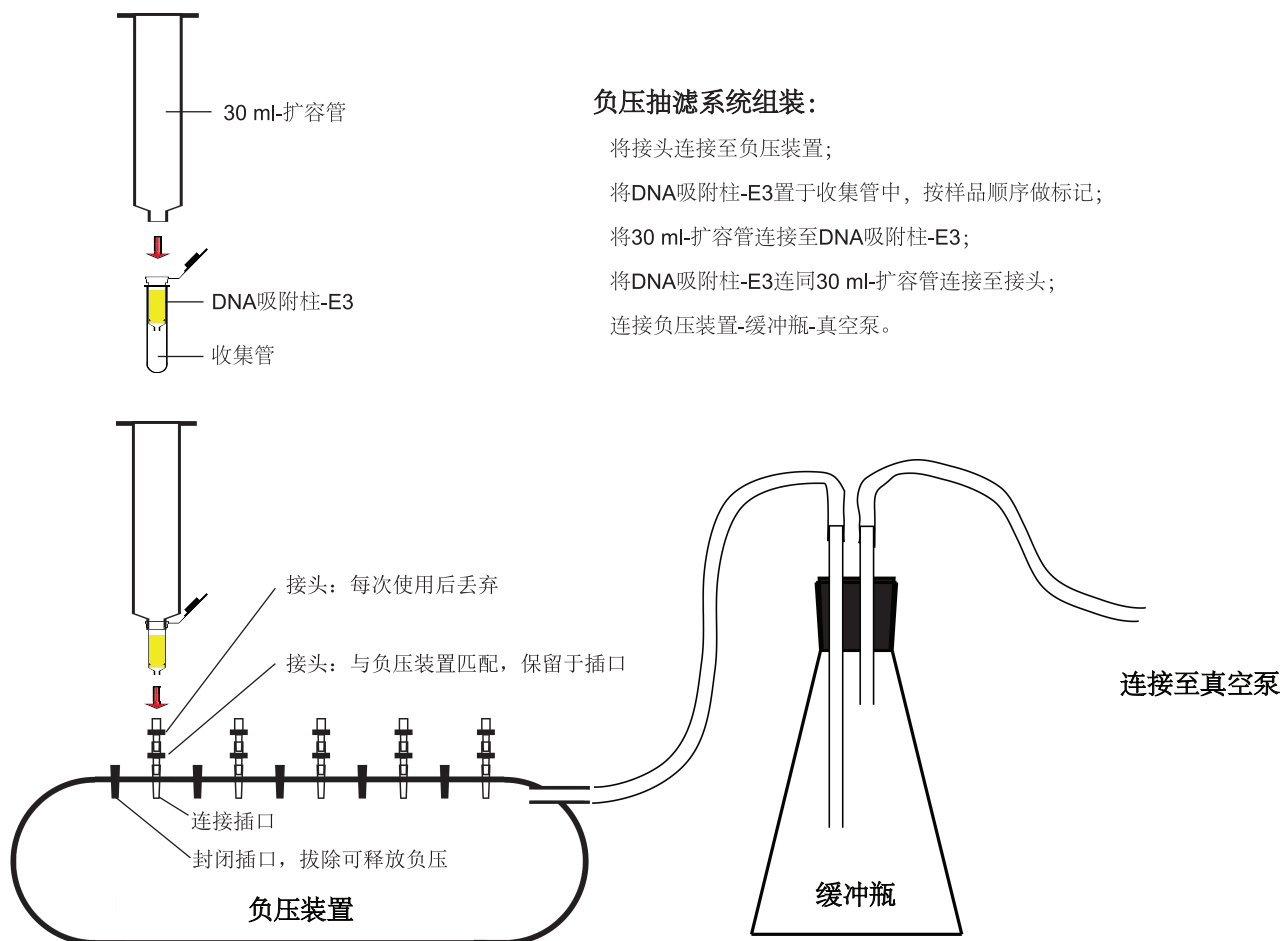
§Buffer WE, 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无热源无水乙醇, 混合均匀。

\*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、负压抽滤系统组装与拆卸



## 五、实验原理与相关注意事项

### (一) 细菌培养、收集——步骤 1

建议细菌培养方式：

第一天：下午，从新鲜平板（一周内涂板或划线）挑取单克隆，1-2 ml LB 培养基过夜培养（12-16 小时）。

第二天：上午，取出小摇菌液放 2-8°C 备用。

下午，3,000×g 离心 1 min 收集 1 ml 菌液，1 ml LB 悬浮菌液，1: 1000-5000 接种至新鲜 LB 培养基，过夜培养（12-16 小时）。

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。

离心收集细菌后需尽可能去除离心上清，建议将离心管/瓶在吸水纸上倒扣 1-5min。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。

### (二) 悬浮细菌——步骤 2

请勿在 Buffer PS 中添加 RNase，后续步骤中 SDS 会抑制大部分 RNase 活性。

需充分悬浮细菌，不然会影响裂解并造成基因组 DNA 残留。

### (三) SDS/碱裂解、中和、降解 RNA 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<sup>+</sup>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，此步骤可用力摇晃。用力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。

中和后游离 SDS 浓度极低，此时加入 RNase 可保持较高活性，后续长时间室温放置与离心过程有利于 RNase 充分降解 RNA，延长放置/离心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-MP 填充大孔径过滤材质，溶液可自然滤过；请勿离心，不然颗粒物会穿过滤材。

### (四) 选择性吸附 DNA——步骤 7

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。可拆卸的 30-ml 扩容管增加了溶液过滤体积，并实现了大体积溶液小管操作，方便了后续操作过程。

通常负压抽滤 5-15 min 即可完全滤过，溶液滤过所需时间与质粒 DNA 总量成正相关。

### (五) 漂洗去除内毒素——步骤 8

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。

通常负压抽滤 2-3 min 溶液可完全滤过，如负压抽滤 5 min 仍有溶液残留可能是质粒 DNA 总量超过 2 mg 或大量 RNA 残留(步骤 4 未添加 RNase)。

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。

### (六) 洗脱 DNA——步骤 9

试剂盒提供的 2 ml 离心管与 DNA 吸附柱匹配，请按 page6-4 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。

### (七) 分相去除内毒素——步骤 10

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 925  $\mu$ l，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。

### (八) 沉淀 DNA 与洗涤——步骤 11-12

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。

DNA 总量超过 1.5 mg 时，加入异丙醇摇晃后出现明显的絮状物，需用力摇晃多次(约 40 次)释放絮状物中包裹的溶液。

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。

## （九）溶解——步骤 13

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 可直接用于转染与动物注射。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 量和实验所需浓度决定溶解体积；通常使用 1/200 菌液体积作为溶解体积，高拷贝质粒浓度为 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。使沉淀物脱管底能明显加快溶解速度，通常按步骤 13 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。

## 六、实验准备

1. 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。
2. 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°C 放置数分钟，沉淀溶解后恢复至室温(约 20min)后使用。
3. 每次使用前，检查 Buffer EP3 是否析晶体状沉淀，如有沉淀在 55-80°C 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。
4. 无热源异丙醇。

## 七、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 $\times$ g）

### 1. 离心收集细菌：

3,000 $\times$ g 离心 10 min 收集 100-200 ml 含高拷贝质粒的 LB 菌液或 200-400 ml 含低拷贝质粒的 LB 菌液；

如因离心条件限制只能使用 50 ml 离心管收集细菌，可分多管离心后用 5-10 ml Buffer PS 悬浮细菌后合并至一管，再次离心收集细菌。

倒弃上清，将离心管/瓶倒扣在吸水纸上 1-5 min 彻底去除溶液。

### 2. 悬浮细菌：

加入 **5 ml Buffer PS**（请勿添加 RNase），Vortex 震荡或用力摇晃悬浮细菌，直至无可见的菌块。

### 3. 裂解：

加入 **10 ml 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 **10 ml Buffer EP3**，用力摇晃 10 次，加入 **50  $\mu\text{l}$  RNase A1**，用力摇晃 10 次，室温放置 20 min；

6,000 $\times$ g 离心 20 min 或 3,000 $\times$ g 离心 30 min。

### 5. 过滤去除悬浮物：

将溶液转入**预过滤柱-MP**(置于 50 ml 离心管)，静置使溶液自然滤过，约 1 min，丢弃**预过滤柱-MP**-----！**请勿离心**

**！通常滤液体积为 22-23ml，如转移过程损失大量溶液，需估测滤液体积，操作步骤 7 中 Buffer EP4 用量为滤液体积的 2/9**

### 6. 组装负压抽滤系统（见 page6-2 图示），可在步骤 4-5 等待期间完成如下工作：

将**接头**连接至**负压装置**；

将 **DNA 吸附柱-E3** 置于收集管中，按样品顺序做好标记；

将 **30 ml 扩容管**连接至 **DNA 吸附柱-E3**，连接至**接头**；

连接**负压装置-缓冲瓶-真空泵**。

### 7. 选择性吸附 DNA

在步骤 5 的滤液中加入 **5 ml Buffer EP4**，缓慢翻转 1-2 次，将溶液倒入相应的 30-ml 扩容管中；

开启真空泵使溶液完全滤过，约 5-15 min；

保持负压，卸下 30-ml 扩容管并丢弃（见 page6-2 图示）。

## 8. 漂洗去除内毒素:

加入 **300 µl Buffer EP5**, 负压抽滤 5 min;

关闭真空泵, 释放负压, 将 DNA 吸附柱-E3 转入收集管, 离心 10 秒;

加入 **300 µl Buffer EP5**, 离心 10 秒, 将 DNA 吸附柱-E3 转入另一个干净的收集管中;

加入 **300 µl Buffer EP5**, 离心 1 min。

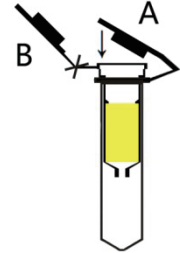
## 9. 洗脱 DNA-----! 此步骤开始需避免外源内毒素污染

将 DNA 吸附柱-E3 转入 2 ml 离心管 (试剂盒携带), 加入 **200 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 **200 µl Buffer EPA**, 室温放置 2 min, 离心 10 秒-----可将洗脱液混合均匀后检测浓度

加入 **200 µl Buffer EPB**, 室温放置 2 min, 离心 1 min, 丢弃 DNA 吸附柱-E3。



## 10. 分相去除残留的内毒素:

加入 **600 µl Buffer EPC**, 用力摇晃 10 次, 室温放置 5 min, 离心 2 min; 仔细吸取 925 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 **200 µl Buffer EPC**; 用力摇晃 10 次, 离心 2 min; 仔细吸取 975 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。

## 11. 沉淀质粒 DNA:

加入 **600 µl 异丙醇**, 用力摇晃 40 次, 离心 5 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

## 12. 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。

## 13. 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 0.5-1 ml 溶解高拷贝质粒, 50-100 µl 溶解低拷贝质粒;

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 1.8-1.85，说明无明显的 RNA 残留。

核酸浓度高于 680 ng/μl 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 μl 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 μl	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 μg 质粒 DNA 与 0.25 λ 标准品混合，100 μl	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 μg 质粒 DNA 加无内毒素水至 100 μl	液态: 内毒素含量 < 0.006 EU/μg DNA (6 EU/mg DNA) 固态: 内毒素含量 > 0.006 EU/μg 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 μg，无凝集反应。