



YALEPIC[®] 无内毒素质粒 DNA 大量提取试剂盒 (100-300ml)

YALEPIC[®] Endotoxin Free Plasmid DNA Maxi Isolation Kit(100-300ml)

产品货号: YC47013-10 (10T) ; (试) YC47013 (1T)

产品保存及运输条件: 常温运输; 10 ~ 30°C 常温保存。

产品概述

YALEPIC[®] Endotoxin Free Plasmid DNA Maxi Isolation Kit(100-300ml)在碱裂解法裂解细胞的基础上, 通过新型硅基质膜高效专一的结合质粒 DNA, 同时采用特殊的缓冲液系统和去内毒素 Buffer 体系, 可便捷高效提取无内毒素质粒, 并有效地去除基因组 DNA、RNA、蛋白等杂质。溶液包含指示剂, 通过颜色的变化, 指示裂解、中和是否完全, 从而保证质粒提取的质量, 实现操作的可视化。本试剂盒每次可处理 100 ~ 300 ml 菌液, 整个提取过程只需 45 min。所得质粒内毒素残留低、纯度高、质量稳定, 特别适用于多种细胞转染, 同时也适用于酶切、测序、PCR、体外转录等下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YC47013-10	(试) YC47013
①	PA Buffer	125 ml	13 ml
②	PB Buffer (Blue)	125 ml	13 ml
③	ER Buffer	125 ml	13 ml
④	YS Buffer	25 ml	3 ml
⑤	PW Buffer	50 ml	22 ml
⑥	Endotoxin-Free YEB Buffer	30 ml	4 ml
⑦	Filter Columns FC2	10 T	1 T
⑧	Pure Columns DT with Collection Tubes	10 T	1 T
⑨	Centrifuge Tubes (50 ml)	10 T	1 T
⑩	RNase A (10 mg/ml)	2 x 1 ml	220 μl

适用范围

100 ~ 300 ml 过夜培养的菌液, 大规模提取质粒。



自备试剂及仪器

无水乙醇；异丙醇；涡旋振荡仪；高速离心机；恒温水浴锅；Nuclease-free 移液器吸头；50 ml Nuclease-free 离心管。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施，穿戴实验服、手套、口罩等。使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品，试剂使用完后立即盖好瓶盖，避免交叉污染的风险。
2. 首次使用前将 **RNaseA** 溶液全部加入 **PA Buffer** 中，混匀后 2 ~ 8°C 保存。每次使用前放置室温恢复温度后使用。
3. 首次使用前向 **PW Buffer** 中加入标签指定量的无水乙醇。试用装 (1T) 中 **PW Buffer** 已含无水乙醇，使用后请立即盖好瓶盖防止乙醇挥发。
4. 使用前检查 **PB Buffer**、**ER Buffer** 是否出现结晶或沉淀，如有沉淀，可在 37°C 水浴加热溶解。
(注：请勿直接接触溶液，使用时应戴乳胶手套，使用后应立即盖紧盖子并确保拧紧瓶盖)
5. 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、培养浓度、质粒拷贝数、质粒的稳定性等因素有关。处理低拷贝质粒或 ≥ 10 kb 大质粒时，应加大菌液体积，并按比例扩大 **PA**、**PB**、**ER Buffer** 的用量，将 **Endotoxin-Free YEB Buffer** 预热至 56°C 并适当延长吸附和洗脱时间以提高洗脱效率。
6. **Pure Columns DT** 置于 2-8°C 可延长保质期。
7. 平衡后的 **Pure Columns DT** 需立即使用，避免放置时间过长影响使用效果。

实验流程

1. 柱平衡：向已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns DT with Collection Tubes**) 中加入 2 ml **YS Buffer**，8,000 ~ 12,000 x g，离心 2 min，弃去收集管中废液，将吸附柱重新放回管中。
(注：需当天处理使用吸附柱)
2. 取 150 ml 过夜培养的菌液，加入离心管 (自备) 中，8,000 ~ 12,000 x g 离心 2 ~ 3 min 收集细菌，彻底吸弃上清。(注：可以分多次在同一个 50 ml 管内加入菌液、离心、弃上清等步骤收集菌体)
3. 向离心管中加入 12 ml **PA Buffer** (确认已加入 RNase A)，用移液器或涡旋振荡器充分混匀，使细菌沉淀悬浮。(注：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，使提取量和纯度偏低)
4. 向离心管中加入 12 ml **蓝色 PB Buffer**，温和地上下颠倒混匀 8~10 次，使菌体充分裂解，形成蓝色透亮粘稠溶液，指示完全裂解，室温放置 3min，不超过 5 min。(注：不要剧烈振荡，避免打断基因组 DNA，造成污染。若溶液并未变得蓝色清亮，可能是菌量过大，裂解不彻底，需减少菌体量)



5. 向离心管中加入 12 ml **ER Buffer**，立即温和上下颠倒混匀 10 ~ 12 次，此时溶液由蓝色变成透明，并出现白色絮状沉淀，室温放置 5 min。13,000 rpm 离心 10 min。将上清全部倒入除内毒素过滤器中 (**Filter Columns FC2**)，避免倒入大块沉淀，缓慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的 50mL 离心管 (自备) 中。(注: ER Buffer 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀; 将溶液转移至过滤器中时应避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器)
6. 向滤液中加 0.3 倍滤液体积的**异丙醇**，上下颠倒混匀。(注: 加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染)
7. 将步骤 6 中的混合溶液转移到步骤 1 中平衡好的吸附柱 (已装入收集管) 中。12,000 x g 离心 2 min，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。(注: 吸附柱最大容积为 15 ml, 第 6 步中所得溶液可分多次过柱。鉴于不同离心机转子的倾斜角度不同, 建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 ml, 以防发生漏液现象)
8. 向吸附柱中加入 10 ml **PW Buffer** (使用前检查是否加入无水乙醇) , 8,000 ~ 12,000 x g 离心 2 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
9. 重复步骤 8。
10. 将吸附柱重新放回收集管中, 8,000 ~ 12,000 x g 离心 5 min, 弃去废液, 将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。
11. 将吸附柱置于一个新的离心管中, 向吸附膜的中间部位加入 1 ~ 2 ml **Endotoxin-Free YEB Buffer**, 室温放置 5 min, 8,000 ~ 12,000 x g 离心 5 min, 弃吸附柱。将质粒溶液收集到离心管中, - 20°C 保存。(下游若需做测序或其他对离子敏感的实验, 需使用 ddH₂O 洗脱, 7.0 < PH < 8.5)
注:
 - 1) 洗脱体积建议不少于 1 ml, 体积过小会降低洗脱效率。
 - 2) 若使用 ddH₂O 洗脱, 应确保 ddH₂O 的 pH 在 7.0 ~ 8.5 范围内。
 - 3) 为增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 室温放置 2 ~ 5 min, 8,000 ~ 12,000 x g 离心 5 min, 将质粒溶液收集到离心管中。
 - 4) 质粒拷贝数较低或 > 10 kb 时, 可将 Endotoxin-Free YEB Buffer 于 56°C 水浴加热后使用, 提高效率。



为了得到高浓度的质粒，可选择浓缩 DNA 操作

1. 每 1 ml 洗脱液加入 1.42 ml 异丙醇以及 0.42 ml 5M NaCl (自备), 混匀, 室温放置 5 min, 8,000 rpm 离心 10 min, 小心弃上清。
2. 加入 0.5 ml 的 70%乙醇洗涤沉淀, 室温 8,000 rpm 离心 5 min, 小心弃乙醇。重复本步骤一次。
3. 空气中干燥沉淀约 5-10 min, 根据需要用适当体积的 YEB 缓冲液或 ddH₂O 溶解沉淀。

常见问题及解决方案

常见问题	原因	解决方案
质粒 DNA 产量低	1.低拷贝质粒	1) 低拷贝质粒: pBR322, pACYC 及其衍生载体, pSC101 及其衍生载体, SuperCos, pWE15。 2) 高拷贝质粒: pTZ, pUC, pBS, pGM-T。 对于低拷贝质粒应加大菌体使用量, 使用 200~300 ml 过夜培养的菌液, 同时按照比例增加 PA、PB 和 ER 的用量, 洗脱液应 56°C 预热, 以增加提取效率, 其他步骤相同。
	2.大质粒(>10 kb)	使用 200~300 ml 过夜培养的菌液, 同时按照比例增加 PA、PB 和 ER 的用量, 洗脱液应 56°C 预热, 以增加提取效率, 其他步骤相同。
	3.宿主菌株差异	不同宿主对质粒产量也会产生影响。
	4.细菌未充分裂解	确保菌体在 PA 中充分重悬裂解。
	5.菌液保存不当	菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 建议培养细菌前最好先划线或涂布平板活化保存。
基因组 DNA 污染	1.菌液培养时间过长	细菌的培养时间不要超过 16 h。
	2.裂解操作不当	加入 PB 后, 必须温和颠倒混匀; 处理多个样本时, 裂解时间不要超过 5 min。
质粒 DNA 纯度低	1.盐离子残留	确保用 PW Buffer 使用前加无水乙醇; 建议沿吸附柱管壁四周加入, 或加入后盖后颠倒混匀 2~3 次, 有助于减少盐离子残留。
	2.乙醇残留	在最后一次 PW Buffer 洗涤后可将吸附柱离心时间由原来 2 min 延至 5 min。
RNA 残留	1.RNase A 活性下降	已加入 RNase A 的 Buffer PA 长时间室温放置可能会出现酶活下降, 使用后应及时放回 2~8°C, 可保存 6 个月。
	2.菌液量过大	由于菌体数量过多, 导致 PA 中 RNase A 不足以消化菌体中的 RNA, 建议减少菌液。

本产品仅供研究使用, 请勿用于临床诊断