



YALEPIC[®] 无内毒素质粒 DNA 中量提取试剂盒 (5-15 ml)

YALEPIC[®] Endotoxin Free Plasmid DNA Midi Isolation Kit (5-15 ml)

产品货号/规格: YC47007 (50T) ; (试) YC47007 (5T)

产品保存及运输条件: 常温运输; 10 ~ 30°C 室温保存。

产品概述

YALEPIC[®] Endotoxin Free Plasmid DNA Midi Isolation Kit (5-15 ml) 适用于从 5 ~ 15 ml 菌液样本中高效便捷的提取无内毒素质粒。本产品在碱裂解法裂解细胞的基础上, 通过新型硅基质膜高效特异性的结合质粒 DNA, 同时有效地去除基因组 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。本试剂盒采用进口特制吸附膜搭配除内毒素的溶液体系, 所得质粒纯度高、质量稳定, 内毒素残留极低, 特别适用于多种细胞转染, 同时也可用于酶切、测序、PCR、体外转录等下游实验。

产品组分

序号	产品组分	YC47007	(试) YC47007
①	PA Buffer	30 ml	3 ml
②	PB Buffer (Blue)	30 ml	3 ml
③	ER Buffer	30 ml	3 ml
④	IP Buffer	25 ml	2.5 ml
⑤	YS Buffer	15 ml	1.5 ml
⑥	YB Buffer	8 ml	1.5 ml
⑦	PW Buffer	16 ml	8 ml
⑧	Endotoxin-Free YEB Buffer	11 ml	1.1 ml
⑨	RNase A (10 mg/ml)	600 µl	60 µl
⑩	Filter Columns FC with Collection tubes	50 T	5 T
⑪	Pure Columns YN with Collection tubes	50 T	5 T

适用范围

5 ~ 15 ml 过夜培养的菌液。



自备试剂及仪器

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

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 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 **RNase A** 溶液全部加入 **PA Buffer** 中，混匀后 2 ~ 8°C 可保存 6 个月。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 (5T) 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，使用后请立即盖紧盖子并确保拧紧瓶盖)
5. 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。
6. **Pure Columns YN** 置于 2-8°C 可延长保质期。
7. 平衡后的 **Pure Columns YN** 需立即使用，避免放置时间过长影响使用效果。
8. 推荐菌液用量：

菌液	PA	PB	ER
≤ 5 ml	250 μl	250 μl	250 μl
5~10 ml	500 μl	500 μl	500 μl
10~15 ml	750 μl	750 μl	750 μl

实验流程

1. 柱平衡：向已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns YN with Collection tubes**) 中加入 200 μl **YS Buffer**, 13,000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中废液, 将吸附柱重新放回管中。(注：需当天处理并使用吸附柱)
2. 取 5 ~ 15 ml 过夜培养的菌液，加入离心管 (自备) 中，13,000 rpm 离心 1 min, 收集细菌，彻底吸弃上清。
3. 以 5 ~ 10 ml 菌液为例，向离心管中加入 500 μl **PA Buffer** (确认已加入 **RNase A**)，涡旋振荡器充分混匀，悬浮细菌沉淀。(注：若菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，导致提取量和纯度偏低)



4. 向离心管中加入 500 μ l **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, 室温放置 3 ~ 5 min, 不超过 5min。 (注: 不要剧烈振荡, 避免打断基因组 DNA, 造成基因组 DNA 污染。若溶液并未变得清亮, 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 500 μ l **ER Buffer**, 立即温和地上下颠倒混匀 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 3~5 min, 不超过 5min。 13,000 rpm 离心 5 min。 (注: ER Buffer 加入后应立即混匀, 避免产生局部沉淀; 离心时间可适当延长)
6. 将步骤 5 所得溶液转移至加入收集管的过滤柱 (**Filter Columns FC with Collection tubes**) 中, 13,000 rpm 离心 1 min。将收集管中的滤液转移到离心管 (自备) 中。
7. 离心管中加入上清液 0.3 倍体积的 **IP Buffer**, 上下颠倒混匀 15 次。 (注: 加入 IP Buffer 过多容易导致 RNA 污染)
8. 转移至平衡好的吸附柱 (**Pure Columns YN with Collection tubes**) 中, 13,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。 (注: 过滤柱的最大容积为 750 μ l, 若溶液量多可分批过柱)
9. 可选步骤: 向吸附柱中加入 150 μ l **YB Buffer**, 13,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。 (注: 如果宿主菌是 end A⁺ 宿主菌如 TG1, BL21, HB101, JM, ET12567 等, 这些宿主菌含有大量的核酸酶, 易降解质粒 DNA, 推荐采用此步。如果宿主菌是 end A⁻ 宿主菌如 DH5a, TOP10 等, 这一步可省略)
10. 向吸附柱中加入 700 μ l **PW Buffer** (使用前检查是否加入无水乙醇), 13,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液。重复该步骤一次。
11. 将吸附柱重新放回收集管中, 13,000 rpm 离心 2 min, 弃去废液。 (注: 这一步的目的是去除吸附柱中残余的乙醇, 防止残留的乙醇影响后续的酶促反应)
12. 将吸附柱置于一个新的离心管 (自备) 中, 向吸附膜的中间部位加入 100 ~ 200 μ l **Endotoxin-Free YEB Buffer**, 室温放置 3 min, 12,000 rpm 离心 2min, 收集质粒 DNA 溶液, -20°C 长期保存。 (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 30 μ l, 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, 13,000 rpm 离心 2 min。
 - 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。



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	载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。 低拷贝质粒：如 pBR322, pACYC 及其衍生载体, pSC101 及其衍生载体, SuperCos, pWE1 等。 可使用 15 ~ 50 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,洗脱时间延长,以增加提取效率,其他步骤相同。
	2.大质粒 (>10 kb)	使用 15 ~ 50 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,或加入后盖盖颠倒混匀 2 ~ 3 次,有助于减少盐离子残留。
	2.乙醇残留	离心后可室温开盖放置 5 min,彻底去除乙醇残留。
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。