

YALEPIC® 无内毒素质粒 DNA 中量提取试剂盒 (30-50 ml)

YALEPIC® Endotoxin Free Plasmid DNA Midi Isolation Kit (30-50 ml)

产品货号: YC47008 (15T); (试) YC47008 (1T)

产品保存及运输条件:

常温运输; 10 ~ 30°C 室温保存一年。

产品概述

YALEPIC® Endotoxin Free Plasmid Midi DNA Isolation Kit (30-50ml) 适用于从 30~50 ml 菌液样本中高效便捷的提取无内毒素质粒。本产品采用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。本试剂盒离心吸附柱采用进口特制吸附膜搭配除内毒素过滤器, 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	YC47008	(试) YC47008
①	PA Buffer	45 ml	4 ml
②	PB Buffer (Blue)	45 ml	4 ml
③	ER Buffer	45 ml	4 ml
④	YS Buffer	20 ml	2 ml
⑤	PW Buffer	15 ml	5 ml
⑥	YB Buffer	15 ml	1 ml
⑦	Endotoxin-Free YEB Buffer	20 ml	2 ml
⑧	RNase A (10 mg/ml)	800 µl	75 µl
⑨	Filter Columns FC3	15 T	1T
⑩	Pure Columns DY with Collection Tubes	15 T	1T
⑪	Centrifuge Tubes (15 ml)	15 T	1T

适用范围

30 ~ 50ml 过夜培养的菌液。

自备试剂及仪器

无水乙醇；异丙醇；涡旋振荡仪；高速离心机；Nuclease-free 移液器吸头；1.5 ml、15 ml、50 ml Nuclease-free 离心管；恒温水浴锅（37°C）。

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 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（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. 平衡后的 **Pure Columns DY** 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 DY** 中加入 1 ml **YS Buffer**，5,000 rpm 离心 1 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 30 ~ 50 ml 过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，5,000 rpm 离心 10 min 收集细菌，彻底吸弃上清。
3. 向离心管中加入 2.5 ml **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：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 2.5 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 2.5 ml **ER Buffer**，立即上下颠倒混匀 10 ~ 12 次，此时应出现白色絮状沉淀，室温放置 5 min。5,000 rpm 离心 10 min。将上清转移至过滤器 (**Filter Columns FC3**) 中，缓慢推动推柄过滤，将滤液收集在干净的 15 ml 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. 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇 (自备), 上下颠倒混匀 15 次后转移至步骤 1 平衡好的吸附柱 (已装入收集管) 中, 5,000 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: 吸附柱的最大容积为 4 ml, 如溶液量多可分多次过柱)
7. 可选步骤: 向吸附柱中加入 1ml **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, 可省略该步骤)
8. 向吸附柱中加入 2 ml **PW Buffer** (确认已加入无水乙醇), 5,000 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。重复该步骤一次。
9. 将吸附柱重新放回收集管中, 5,000 rpm 离心 2 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。
10. 将吸附柱置于新的 15 ml 离心管中, 向吸附膜的中间加入 0.5 ~ 1 ml **Endotoxin-Free YEB Buffer**, 室温放置 5 min, 5,000 rpm 离心 2 min, 弃吸附柱, 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 0.5 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 5 min, 5,000 rpm 离心 2 min。
- 4) 质粒拷贝数较低或 > 10 kb 时, 可将 Endotoxin-Free YEB Buffer 于 65°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 50 ~ 100 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 65°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 50 ~ 100 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 65°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。
内毒素残留高	1.加入 ER Buffer 后未充分混匀	加入 ER Buffer 后应充分混匀, 可增加上下颠倒次数至 20 次, 离心后上清应为清亮
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