

## 通用型质粒大提试剂盒

### HX3040

#### 产品简介

通用型质粒大提试剂盒是一种用于从大肠杆菌中进行大量质粒快速抽提的通用型离心柱式试剂盒。不仅适用于常用的 EndA<sup>-</sup> 菌株 DH5 $\alpha$ 、JM109 和 XL-1 blue 等，也适用于 EndA<sup>+</sup> 菌株如 JM110、BL21 (DE3)、TG1 和 HB101 等，能有效避免 EndA<sup>+</sup> 菌株中高丰度核酸酶的污染，并适用于从糖类修饰水平高的野生菌株中提取质粒。野生型大肠杆菌中表达 Endonuclease I，能切割并降解双链 DNA。编码 Endonuclease I 的基因是 *endA*，如果 *endA* 突变失活，其基因型会被标注为 *endA1*，相应的突变菌株被称为 EndA<sup>-</sup> 菌株，而野生型菌株则被称为 EndA<sup>+</sup> 菌株。常见的 EndA<sup>-</sup> 和 EndA<sup>+</sup> 菌株参见表 1。从 EndA<sup>+</sup> 菌株中抽提的质粒，微量核酸酶和质粒结合而容易被共纯化，导致容易降解，而本试剂盒增加了特殊的洗涤步骤（核酸酶洗涤液溶液 PB 洗涤），可以有效避免 EndA<sup>+</sup> 菌株中抽提获得的质粒容易降解的问题。

本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱。在特定条件下，使质粒能在离心过柱的瞬间，结合到质粒纯化柱上，在一定条件下又能将质粒充分洗脱，从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提，无需酒精沉淀，6 个样品只需不足 90 min 即可完成。每个质粒纯化柱可以结合的质粒量的上限约为 500  $\mu$ g，可用于抽提约 100 ml LB 培养过夜的大肠杆菌。抽提所得质粒的 OD260 和 OD280 比值一般在 1.80 左右，因菌种不同等原因会略有波动，质粒量受质粒拷贝数等因素影响。抽提所得到的质粒可直接用于转染细胞，DNA 测序，PCR，基于 PCR 的突变，体外转录，转化细菌，内切酶消化等。在使用 Buffer PB 的情况下，获得的质粒的纯度更高，内毒素含量低，总体上转染细胞的效率会显著提供。

EndA <sup>-</sup>	EndA <sup>+</sup>
BJ5183	BL21 (DE3)
DH1	CJ236
DH20	HB101
DH21	JM83
DH5 $\alpha$	JM101
JM103	JM110
JM105	LE392
JM106	MC1061
JM107	NM522 (all NM series are EndA <sup>+</sup> )

JM108	NM554
JM109	P2392
MM294	PR700 (all PR series are EndA <sup>+</sup> )
SK1590	Q358
SK1592	RR1
SK2267	TB1
SRB	TG1
TOP10	Y1088 (all Y10 series are EndA <sup>+</sup> )
XL1-Blue	BMH 71-18
XLO	ES1301

表 1. 常见的 EndA 和 EndA<sup>+</sup> 菌株。

## 产品应用

用于从大肠杆菌中进行大量质粒快速抽提，抽提所得到的质粒可直接用于转染细胞，DNA 测序，PCR，基于 PCR 的突变，体外转录，转化细菌，内切酶消化等。

## 储存条件

室温保存，一年有效。

## 产品信息

组分编号	组分名称	规格
		20 T
HX3040-1	Buffer S1 (悬浮液)	105 ml
HX3040-2	Buffer P1 (裂解液)	105 ml
HX3040-3	Buffer P2 (结合液)	150 ml
HX3040-4	Buffer PB (核酸酶洗涤液)	210 ml
HX3040-5	Buffer WB (洗涤液，首次使用前加入 150 ml 无水乙醇)	100 ml
HX3040-6	Buffer EB (洗脱液)	60 ml
HX3040-7	RNase A (100 mg/ml)	105 $\mu$ l
HX3040-8	大抽质粒纯化柱及废液收集管	20 套

## 注意事项

1. 温度较低时，Buffer P1 和 Buffer P2 可能会有沉淀产生，使用前必须检查一遍。如有沉淀，37°C 水浴加热溶解，混匀后使用。
2. Buffer P1 请勿过分剧烈混匀，否则会产生大量气泡，使用后，一定要盖紧瓶盖，防止被空气中二氧化碳酸化。Buffer P1 有强碱性，Buffer P1、Buffer P2、Buffer PB 和 Buffer WB 对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
3. 所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。废液收集管在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。
4. **首次使用前把试剂盒提供的 RNase A 全部加到 Buffer S1 中，混匀，并在瓶上做好标记。加入 RNase A 后 4°C 存放。**
5. **首次使用前在 Buffer WB 中加入 150 ml 无水乙醇，混匀，并在瓶上做好标记。**
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

1. 取过夜菌至 50 ml 离心管内，5000 g 离心 1 min 收集细菌沉淀，弃上清。再重复一次，每管共收集 100 ml 过夜菌沉淀。  
**注：**通常大肠杆菌宜用 LB 培养过夜（16 h 左右）至 OD 值为 2-4。建议 5000 g（通常为 5000 rpm 左右）室温离心 1 min，如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密，不利于加入 Buffer S1 后散开沉淀。直接倒掉上清，再倒入约 50 ml 菌液并重复上述操作，然后倒置于吸水纸上（可用普通草纸），使液体流尽。如果细菌密度明显偏低，可考虑使用更多菌液，再重复上述操作 1-2 次。对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过 150 ml，对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过 200 ml。过量的细菌会导致后续的裂解不充分。
2. 每管加入 5 ml Buffer S1，重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开，无可见细菌团块。  
**注：**确认 Buffer S1 中已经添加了 RNase A。最高速度 vortex 5-10 sec 或更长时间，悬起沉淀。一定要充分混匀，对着光亮处观察应呈均匀的悬浊液，无明显细菌团块或絮块。如果没有 vortex，可以用枪吹打沉淀使沉淀逐渐散开或用手指把沉淀弹开。
3. 每管加入 5 ml Buffer P1，轻轻颠倒离心管 4-6 次，室温放置 1-2 min，使细菌完全裂解，溶液透明。  
**注：**切勿 vortex! vortex 或其它剧烈操作会导致基因组 DNA 断裂，易导致最终所得质粒被基因组 DNA 污染。颠倒 4-6 次后，溶液应变得透明，无团块或絮状物。如果加入 Buffer S1 后细菌没有完全散开，那么颠倒

4-6 次后，可能还会有团块或絮状物。遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数 3-5 次，再室温放置 2-3 min，但总裂解时间不可超过 5 min。

4. 每管加入 7 ml Buffer P2，随即颠倒离心管 4-6 次混匀，可见白色絮状物产生。

**注：**切勿 vortex！颠倒次数也不宜过多，否则易导致最终所得质粒的质量下降。

5. 12,000-14,000 rpm 室温离心 10 min。

**注：**如果离心机的最高速度较低，例如约 5000-6000 rpm 时，需要适当延长离心时间，例如 20-30 min，直至沉淀充分。离心时可以准备好质粒纯化柱，自制漏斗等，并在纯化柱上标上记号。

6. 将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。12,000-14,000 rpm 离心 2 min，倒弃收集管内液体。

**注：**质粒倒入质粒纯化柱后，可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。本步骤及后续需要 12,000-14,000 rpm 离心 2 min 的步骤，如果离心机的最高速度较低，需要适当延长离心时间，例如约 5000-6000 rpm 时需要离心约 5 min 或更长时间，直至液体全部穿柱。如果离心后有少量漂浮物，可以考虑再次离心，或者使用擦镜纸两次对折后打开形成的自制漏斗，以过滤去除漂浮物。

7. **选做：**在质粒纯化柱内加入 10 ml Buffer PB，12,000-14,000 rpm 离心 2 min，洗去核酸酶污染等杂质，倒弃收集管内液体。

**注：**本步骤对于从 EndA<sup>+</sup> 菌株如 JM110、BL21 (DE3)、TG1 和 HB101 等中提取质粒并去除核酸酶污染是必须的，对于从其它任何具有较高核酸酶表达水平和糖类修饰水平的菌株中提取质粒也是非常必须的。参考表 1，对于一些常用的 EndA<sup>-</sup> 菌株如 DH5 $\alpha$  和 XL-1 blue 等如果后续仅用于酶切、PCR、反转录等常规分子生物学操作，并不需要本步骤。如果抽提获得的质粒用于细胞转染，宜增加本步骤。

8. 在质粒纯化柱内加入 12 ml Buffer WB，12,000-14,000 rpm 离心 2 min，洗去杂质，倒弃收集管内液体。

**注：**加入 Buffer WB 后可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。

9. 12,000-14,000 rpm 再次离心 2 min，除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。

**注：**倒弃收集管内液体后再离心，才能彻底去除微量的 Buffer WB。微量的 Buffer WB 会影响质粒的质量。

10. 将质粒纯化柱置于洁净 50 ml 离心管上，加入 2 ml Buffer EB 至管内柱面上，放置 2 min。

**注：**也可以用重蒸水或 Milli-Q 级纯水替代 Buffer EB，但是水的 pH 应不小于 6.5。Buffer EB 加入后放置时间稍长，对于增加质粒产量会略有帮助。如想得到较高浓度的质粒，可以加入 1 ml Buffer EB 洗脱，质粒得率实测减少约 5-10%，具体减少量与特定样品有关。

11. 12,000-14,000 rpm 离心 2 min，所得液体即为高纯度质粒。通常所得质粒浓度为 0.1-0.3 mg/ml 左右。如果想得到高浓度的质粒，采用如下的异丙醇沉淀方法浓缩质粒或常规的乙醇沉淀方法。

a. 加入 0.7 倍体积的常温异丙醇（例如 1 ml 待浓缩质粒中加入 0.7 ml 异丙醇），混匀后 12,000-14,000 rpm

4°C 离心 10 min, 小心吸去上清液, 避免触及沉淀。如果希望获得较高浓度的质粒, 在洗脱时推荐采用 1 ml Buffer EB 进行洗脱, 后续可以转移到 2 ml 离心管内进行异丙醇沉淀, 这样操作起来相对比较方便。

异丙醇沉淀的 DNA 为玻璃状近透明的颗粒状沉淀, 和乙醇沉淀产生的含盐沉淀物相比较难观察清楚。离心后取放离心管要尽量轻柔, 避免沉淀松动或部分颗粒状悬浮至溶液中。不推荐直接倒弃上清, 直接倒弃上清时经常出现直接把质粒沉淀倒掉的情况; 如果偏好直接倒弃上清, 建议把上清倒弃至一洁净离心管内, 这样万一沉淀被倒出, 仍然可以从洁净离心管中回收。推荐用移液枪吸去上清, 并注意尽量避免吸走沉淀。

- b. 加入 1 ml 常温 70%乙醇溶液, 轻轻悬起质粒沉淀以充分洗涤, 12,000-14,000 rpm 4°C 离心 5-10 min, 小心吸去上清液, 避免触及沉淀。
- c. 5,000-10,000 rpm 4°C 离心 5-10 sec, 用 20  $\mu$ l 或 200  $\mu$ l 移液器小心吸净残留液体, 避免触及沉淀。
- d. 肉眼观察无明显液体后 (吸净液体后通常在 1 min 内即可完成干燥), 加入适当体积的溶液 (如 Buffer EB、10 mM Tris-Cl pH8.5 或 Milli-Q 级纯水) 溶解 DNA。

**注:** DNA 样品不能过于干燥, 否则很难溶解。最好在弱碱性条件下溶解 DNA, 溶解时可用缓冲液反复冲洗管壁, 使管壁上的 DNA 充分溶解。