

GeticoFect™ PurePlasmid preparation Kit

产品说明书

操作步骤

一、适用范围

本标准操作流程适用于使用 Pureplasmid HiPure 质粒过滤纯化试剂盒进行质粒 DNA 的中量 (Midiprep) 和大量 (Maxiprep) 制备。该方法可从大肠杆菌中高效分离高质量的质粒 DNA, 所得纯化后的质粒 DNA 可用于多种下游应用, 如哺乳动物转染、测序、PCR、克隆、体外转录、限制性酶切等实验。

二、试剂盒组成与储存

(一) 试剂盒组成

试剂盒分为中量制备和大量制备两种类型, 分别用于不同规模的质粒提取。

(二) 缓冲液成分

缓冲液	成分
重悬缓冲液 (R3)	50mM Tris - HCl, pH8.0; 10mM EDTA
RNase A	20mg/mL (溶于重悬缓冲液 R3)
裂解缓冲液 (L7)	0.2M NaOH; 1% (w/v) SDS
沉淀缓冲液 (N3)	3.1M 醋酸钾, pH5.5
平衡缓冲液 (EQ1)	0.1M 醋酸钠, pH5.0; 0.6M NaCl; 0.15% (v/v) Triton X - 100
洗涤缓冲液 (W8)	0.1M 醋酸钠, pH5.0; 825mM NaCl
洗脱缓冲液 (E4)	100mM Tris - HCl, pH8.5; 1.25M NaCl
TE 缓冲液 (TE)	10mM Tris - HCl, pH8.0; 0.1mM EDTA

(三) 储存条件

试剂盒所有组分运输时均为室温条件, 收到试剂盒后, 将所有组分室温保存即可。

三、实验前准备

(一) 细菌培养

1. 在含有相应抗生素的 LB 培养基中，将转化后的大肠杆菌细胞进行过夜培养。培养条件应确保细菌培养物的细胞密度达到约 10^9 个细胞 /mL，或在 600nm 处的吸光度 (A600) 为 1 - 1.5，此时细菌处于对数生长期向稳定期过渡阶段，最适宜用于后续实验。
2. 根据所使用质粒的拷贝数确定起始细菌培养物体积：
 - 高拷贝数质粒：中量制备使用 15 - 25mL 过夜培养物；大量制备使用 100 - 200mL 过夜培养物。
 - 低拷贝数质粒：中量制备使用 25 - 100mL 过夜培养物；大量制备使用 250 - 500mL 过夜培养物。

(二) 试剂准备

1. **重悬缓冲液 (R3)**：按照瓶身标签说明，向重悬缓冲液 (R3) 中添加 RNase A，充分混合，使最终浓度达到 100 μ g/mL。标记好瓶身，表明已添加 RNase A，然后将该缓冲液储存于 4°C。
2. **裂解缓冲液 (L7)**：使用前检查裂解缓冲液 (L7) 是否有沉淀产生。若有沉淀，可将溶液在 37°C 短暂加热，直至沉淀完全溶解。

(三) 器材准备

1. 根据实验需求，准备无菌的微量离心管、用于收集细胞的离心管或离心瓶。
2. 配备合适的离心机及转子，确保其能够满足相应的离心条件：收集细胞时，使用能在 4°C、4000 \times g 条件下离心的离心机；沉淀 DNA 时，需使用能在 4°C、大于 12,000 \times g 条件下离心的离心机。
3. 准备可承受相应离心力的 15mL (中量制备) 或 50mL (大量制备) 离心管。
4. 若需要，可准备用于放置过滤柱的支架。
5. 准备异丙醇、70% 乙醇用于 DNA 沉淀及洗涤。
- 6.

(四) 操作注意事项

1. 操作过程中应严格保持无菌环境，避免 DNA 受到 DNase 的污染。所有与 DNA 接触的设备，如移液器吸头、离心管等均需无菌处理。
2. 严禁将 DNase 引入试剂盒提供的无菌溶液中。
3. 使用合适的支架确保中量和大量过滤柱在放置于锥形瓶 (或类似容器) 口时保持直立。
4. 务必按照操作步骤进行推荐的洗涤步骤，以获得最佳实验结果。
5. 建议使用试剂盒提供的 TE 缓冲液 (TE) 或 10mM Tris - HCl, pH8.5 来重悬 DNA 沉淀。

四、中量制备 (Midiprep) 操作步骤

(一) 过滤柱平衡

1. 将 HiPure 过滤中量柱通过合适的方式放置在锥形瓶 (或类似容器) 口，确保过滤柱保持直立。
2. 向中量柱内的过滤芯直接加入适量平衡缓冲液 (EQ1)。
3. 让平衡缓冲液依靠重力自然流下，直至流尽。在平衡缓冲液流下的过程中，可同步进行细胞裂解液的制备。

(二) 细胞裂解液制备

1. 根据质粒拷贝数确定使用的过夜 LB 培养物体积：高拷贝数质粒使用 15 - 25mL；低拷贝数质粒使用 25 - 100mL。
2. 将培养物转移至离心管中，在 4°C、4000×g 条件下离心 10 分钟，收集细胞沉淀，然后小心移除所有培养基。
3. 向装有细胞沉淀的离心管中加入适量含有 RNase A 的重悬缓冲液 (R3)，轻轻摇晃离心管，直至细胞完全重悬，形成均匀的细胞悬液。
4. 加入适量裂解缓冲液 (L7)，盖上管盖并确保盖紧。通过缓慢颠倒离心管的方式轻轻混合，直至裂解液完全均匀，注意避免剧烈振荡或涡旋。
5. 将裂解液在室温下孵育 5 分钟，严格控制孵育时间，切勿超过 5 分钟。
6. 加入适量沉淀缓冲液 (N3)，立即颠倒离心管进行充分混合，直至溶液均匀，同样避免涡旋。混合完成后，进入下一步“上样及洗涤 DNA”操作。

(三) 上样及洗涤 DNA

1. 将上述制备好的含有沉淀的裂解液，包括所有沉淀物质，小心转移至已平衡好的 HiPure 过滤中量柱中。让裂解液依靠重力自然通过过滤柱，直至流速停止（通常需要 10 - 15 分钟）或变得非常缓慢（小于每 10 秒 1 滴），然后弃去流出液。
2. 若希望提高最终 DNA 产量，可进行如下操作：向 HiPure 过滤中量柱中加入适量洗涤缓冲液 (W8)，用于洗涤残留的细菌裂解液。让洗涤缓冲液依靠重力再次通过过滤柱，直至流速停止或滴液变得非常缓慢。
3. 当裂解液停止从 HiPure 过滤中量柱滴下后，立即小心取出并丢弃柱内的过滤芯。注意过滤芯为一次性使用，不可重复使用。
4. 向中量柱中加入适量洗涤缓冲液 (W8)，让洗涤缓冲液依靠重力自然流下，弃去流出液，之后进入“洗脱 DNA”步骤。

(四) 洗脱 DNA

1. 在 HiPure 过滤中量柱下方放置一个无菌的 15mL 离心管作为洗脱管。
2. 向中量柱中加入适量洗脱缓冲液 (E4)，让洗脱缓冲液依靠重力自然流下，切勿强行挤出剩余溶液。此时，洗脱管中收集到的即为纯化后的 DNA 溶液。
3. 丢弃使用过的 HiPure 过滤中量柱。
4. 根据实际情况，选择使用 Pureplasmid HiPure 沉淀模块（见相关操作说明）或按照“异丙醇沉淀 DNA”步骤继续处理 DNA。

(五) 异丙醇沉淀 DNA

1. 向含有 DNA 的洗脱管中加入适量异丙醇，充分混合均匀。
2. 将 DNA - 异丙醇混合液在室温下孵育 2 分钟。
3. 将离心管在 4°C、大于 12,000×g 条件下离心 30 分钟，小心取出离心管，缓慢倾倒并弃去上清液。
4. 向离心管中加入适量 70% 乙醇，重悬 DNA 沉淀。
5. 在 4°C、大于 12,000×g 条件下再次离心 5 分钟，小心移除并弃去上清液。

6. 将 DNA 沉淀在空气中干燥约 10 分钟。
7. 对于高拷贝数质粒，使用适量 TE 缓冲液 (TE) 重悬 DNA 沉淀；对于低拷贝数质粒，使用适量 TE 缓冲液 (TE) 重悬。偶尔可能会出现不溶性颗粒，这些颗粒不影响 DNA 质量，可通过在室温下高速离心 1 分钟，将上清液 (DNA 样品) 转移至新的离心管中去除。

(六) DNA 储存

将纯化后的 DNA 储存于 -20°C 长期保存；若近期使用，可储存于 4°C。为避免 DNA 反复冻融，若长期保存，建议将 DNA 进行分装后再储存于 -20°C。

五、大量制备 (Maxiprep) 操作步骤

(一) 过滤柱平衡

1. 将 HiPure 过滤大量柱通过合适的方式放置在锥形瓶 (或类似容器) 口，保证过滤柱直立。
2. 向插入在大量柱内的过滤芯直接加入适量平衡缓冲液 (EQ1)。
3. 使平衡缓冲液依靠重力自然流尽。在平衡缓冲液流下的过程中，同步准备细胞裂解液。

(二) 细胞裂解液制备

1. 根据质粒拷贝数确定过夜 LB 培养物的使用体积：高拷贝数质粒使用 100 - 200mL；低拷贝数质粒使用 250 - 500mL。
2. 将培养物转移至合适的离心管或离心瓶中，在 4°C、4000×g 条件下离心 10 分钟，收集细胞沉淀，完全移除培养基。
3. 向细胞沉淀中加入适量含有 RNase A 的重悬缓冲液 (R3)，充分重悬细胞，使其成为均匀的悬液。
4. 加入适量裂解缓冲液 (L7)，盖紧管盖，缓慢颠倒离心管进行轻柔混合，直至裂解液均匀，避免涡旋。将混合液在室温下孵育 5 分钟，严格控制孵育时间，不可超过 5 分钟。
5. 加入适量沉淀缓冲液 (N3)，迅速颠倒离心管充分混合均匀，避免涡旋。之后进入“上样及洗涤 DNA”步骤。

(三) 上样及洗涤 DNA

1. 将制备好的含有沉淀的裂解液，全部转移至已平衡的 HiPure 过滤大量柱中。让裂解液依靠重力自然通过过滤柱，直至流速停止 (一般 10 - 15 分钟) 或变得极慢 (小于每 10 秒 1 滴)，弃去流出液。
2. 若想提高最终 DNA 产量，可选择如下操作：向 HiPure 过滤大量柱中加入适量洗涤缓冲液 (W8)，洗涤残留的细菌裂解液。让洗涤缓冲液依靠重力再次通过过滤柱，直至流速停止或滴液变得很慢。
3. 当裂解液停止从 HiPure 过滤大量柱滴下后，立刻取出并丢弃柱内的过滤芯。注意过滤芯仅能使用一次，不可重复利用。
4. 向大量柱中加入适量洗涤缓冲液 (W8)，使洗涤缓冲液依靠重力自然流下，弃去流出液，然后进入“洗脱 DNA”步骤。

(四) 洗脱 DNA

1. 在 HiPure 过滤大量柱下方放置一个无菌的 50mL 离心管作为洗脱管。
2. 向大量柱中加入适量洗脱缓冲液 (E4), 让洗脱缓冲液依靠重力自然流下, 不要强行挤出剩余溶液。此时, 洗脱管中收集到的即为纯化后的 DNA 溶液。
3. 丢弃使用过的 HiPure 过滤大量柱。
4. 根据实际情况, 选择使用 Pureplasmid HiPure 沉淀模块 (操作见相关说明) 或按“异丙醇沉淀 DNA”步骤处理 DNA。

(五) 异丙醇沉淀 DNA

1. 向含有 DNA 的洗脱管中加入适量异丙醇, 充分混合均匀。
2. 将离心管在 4°C、大于 12,000×g 条件下离心 30 分钟, 小心取出离心管, 缓慢倒掉上清液。
3. 向离心管中加入适量 70% 乙醇, 重悬 DNA 沉淀。
4. 在 4°C、大于 12,000×g 条件下再次离心 5 分钟, 小心移除并弃去上清液。
5. 将 DNA 沉淀在空气中干燥约 10 分钟。
6. 对于高拷贝数质粒, 使用适量 TE 缓冲液 (TE) 重悬 DNA 沉淀; 对于低拷贝数质粒, 使用适量 TE 缓冲液 (TE) 重悬。若存在不溶性颗粒, 可在室温下高速离心 1 分钟, 将上清液 (DNA 样品) 转移至新的离心管中去除。

(六) 使用沉淀模块沉淀 DNA

1. 向含有 DNA 的洗脱管中加入适量异丙醇, 充分混合均匀, 室温孵育 2 分钟。
2. 从包装中取出一个合适的注射器 (沉淀模块配套), 移除活塞。
3. 通过鲁尔锁接口将 Pureplasmid HiPure 沉淀模块连接到注射器的喷嘴上。
4. 将沉淀后的 DNA 混合液装入注射器, 把沉淀模块置于废液容器上方, 插入活塞, 缓慢、匀速地推动活塞, 使 DNA 混合液通过沉淀模块, 弃去流出液。
5. 从注射器上取下沉淀模块, 移除活塞, 然后重新将沉淀模块连接到注射器上。注意在沉淀模块仍连接在注射器上时, 不要移除活塞, 以免损坏膜。
6. 向注射器中加入适量 70% 乙醇用于洗涤沉淀模块, 缓慢推动活塞, 使乙醇通过沉淀模块, 弃去流出液。
7. 从注射器上取下沉淀模块, 将其放入一个无菌的离心管中, 在 4°C、大于 12,000×g 条件下离心 2 分钟, 以去除残留的乙醇。
8. 将沉淀模块转移到一个新的无菌离心管中, 加入适量 TE 缓冲液 (TE), 室温孵育 2 分钟, 然后在 4°C、大于 12,000×g 条件下离心 2 分钟, 离心管中的液体即为纯化后的 DNA 溶液。将 DNA 溶液储存于 -20°C 长期保存; 若近期使用, 可储存于 4°C。