

超大量无内毒素质粒

纯化说明书

编号	ZD-TG-34-02
II 型纯化漏斗	2 套
MaxI Endo-free 过滤柱	4 个
50ml 离心管	6 个
溶液 PA	200ml
溶液 PB	200ml
溶液 PC	200ml
RNase A	0.55ml/管 (40mg/ml)
溶液 TE	60ml
溶液 RE	60ml
溶液 CE	45ml
无内毒素水	30ml
70% 乙醇	30ml
说明书	1

存储和稳定性

RNase A-20℃ 保存，盒中其它试剂常温避光保存。有效期 12 个月。

产品介绍

产品基于我司无胍盐质粒纯化系统，有如下的优良特性：

- 高纯度的纯化质粒。既没有胍盐残留，也没有离子交换树脂脱落物的残留。
- 操作方便，费时少。制备 6 mg 质粒只需要 1.5-2 小时。耗费时间大大少于使用离子交换树脂法。

使用前准备

阅读说明书，熟悉操作步骤。准备好所有试剂及相关材料。

重要事项

- 观察溶液 PB 是否有沉淀。室温过低溶液 PB 出现沉淀时，37℃-60℃ 水浴 10min，溶液澄清摇匀后使用。
- 洗脱质粒前预热 TE 或纯水至 60-70℃，有利洗脱。
- 离心均室温进行，低温不利于去除 RNA。
- 首次使用前，用无内毒素的量器向 70%乙醇瓶中加入 70ml 无水乙醇，摇匀后标记备用。
- 从步骤“14”起使用无内毒素枪头和容器移取液体。可在其他供应商处购买无内毒素枪头。玻璃器皿可在清洗干净后 250℃ 烘烤 60min 或 180℃ 过夜烘烤以除去内毒素。

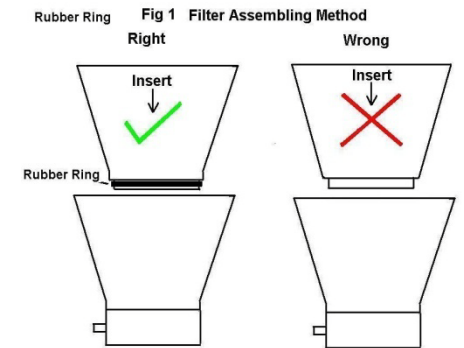
用户自备试剂

100%乙醇、80%乙醇、异丙醇。

操作步骤

(一) 质粒提取

1. 检查并安装纯化漏斗。(检查纯化漏斗是否按右图所示套在一起。如已脱开，按图安装。注意，将上面的过滤杯插入下面的质粒结合杯前，应先将橡皮



圈套入结合杯底凹槽中。将漏斗底座旋紧在一个 500 毫升的洁净 (GL45 螺旋口) 标准瓶上。侧口接上抽真空的橡皮管)。

2. 将大肠杆菌过夜培养液最高转速 ($\geq 8000\times g$) 离心 5min。弃去上清液。
3. 估算菌体沉淀体积。向沉淀中加入 10-15 倍体积的溶液 PA。加入 RNase A 至终浓度为 50-100 $\mu g/ml$ 。充分混悬细胞。
4. 将菌液移入洁净 500ml 烧杯中。加入与 PA 等体积的溶液 PB，迅速充分混匀，室温静置 2-3min (当溶液变澄清时说明细胞已被充分裂解。勿超过 5min，当超过 5min 仍未澄清，表明裂解液用量太少)。
5. 加入与 PA 等体积的溶液 PC，迅速充分混匀 (如果溶液存在发粘拉丝现象说明未充分混匀)。
6. 加入 PA 一半体积的无水乙醇，充分混匀。
7. 小心将液体全部倒入上层的过滤杯 (最多可容纳 210ml 液体) 中，静置 5min。待絮团状的沉淀漂浮在上层后，打开真空泵，抽滤至滤过绝大部分溶液为止 (大约需 3-10min)。关闭真空泵，**缓慢放入空气** (避免因急速升压可能导致的质粒结合杯中垫圈及填料弹出) 使内部气压升至大气压。弃去上层的过滤杯。
注 1: 此法大概损失 10% 体积的溶液。如果要提高得率，可在倒入过滤杯前将液体最高转速 ($\geq 8000\times g$) 离心 10 min，取上清移入过滤杯中，打开真空泵抽滤至液体全部滤过后至下一步。
注 2: 每次最多可过滤 210ml。如果一次过滤不完，必须更换新的过滤杯，重复本步骤。
8. 向质粒结合杯中加入 50ml 80% 乙醇 (自备)。打开真空泵，抽滤 5min，关闭真空泵。
9. 重复步骤“8”一次。
10. 向质粒结合杯中加入 50ml 100% 乙醇 (自备)。打开真空泵，抽滤 15min (去除残留乙醇，无乙醇气味)。关闭真空泵。

注: 真空抽吸 15min 是必须的，否则不能彻底去除乙醇。残留的乙醇会

严重影响质粒洗脱。

11. 将纯化漏斗从收集瓶上旋下后于恒温箱中 70 $^{\circ}C$ 放置 15min。向漏斗底座内层螺口中换上新的 50ml 离心管，旋紧。
12. 向质粒结合杯中加入 20ml TE 溶液 (也可使用同体积自备的纯水)。直立放置 2-3min。打开真空泵，抽吸到液体不再流出为止 (大约收集到 10ml 左右液体)。关闭真空泵。收集管内质粒洗脱液。
注: 收集到 10ml 左右液体中已包含 90% 以上质粒，无需进行多次洗脱或增加洗脱液用量。

(二) 质粒去内毒素

13. 向管内液体中加入其等体积的溶液 RE，颠倒混匀，室温静置 5min。
14. 加入溶液 RE 三分之二体积的溶液 CE，颠倒充分混匀。最高转速 ($\geq 8000\times g$) 离心 10min。
15. 将上清液移入 2 个套有收集管的 Endo-free 过滤柱中。最高转速 ($\geq 8000\times g$) 离心 5min。
16. 弃去过滤柱 (弃前确认过滤柱中已无残留液体，否则再次离心使液体全部滤过)。将滤液用枪头移入新的 50ml 管中。加入等体积的异丙醇，混匀后静置 15min。最高转速 ($\geq 8000\times g$) 离心 10min。弃上清。
17. 加入 70% 乙醇 10ml 清洗沉淀。8000 $\times g$ 离心 10min。弃上清。
18. 重复步骤“17”一次。
19. 敞口放置 5~10min，待乙醇挥发后用适量无内毒素水溶解质粒沉淀。

宁波市重鼎生物技术有限公司

主页: <http://www.genepure.com>

电话: 4008780133