



Endofree Plasmid Maxi Kit (Resin)

无内毒素质粒大量提纯试剂盒 (树脂法)

Cat. No. CW2114

产品简介

本试剂盒是基于高特异性结合质粒DNA的独特树脂微球设计的一款质粒纯化产品,可满足高产量与高纯度的超螺旋质粒制备需求。阴离子交换型树脂微球填充的预装层析柱(COWIN-tip 500),可纯化制备约500 μg 转染级质粒DNA,适用于包括转染(原代、敏感以及悬浮细胞)、显微注射、基因治疗等多种研究。

保存条件

COWIN-tip 500 和 30 mL Syringes 在干燥、室温(15-30 $^{\circ}\text{C}$)环境中可稳定保存不低于2年。加入RNase A的Buffer RES置于2-8 $^{\circ}\text{C}$ 可稳定保存6个月,其他溶液和RNase A试剂可在室温(15-30 $^{\circ}\text{C}$)下稳定保存2年。

产品特点

1. COWIN-tip 500 预装层析柱的质粒载量高达 700 μg ;
2. 本产品制备的质粒内毒素含量 $< 0.05 \text{ EU}/\mu\text{g}$;
3. 通过重力流方式,可在 1.5 小时内完成转染级质粒的制备;
4. 适用于高效提取 3-50 kb大小的不同拷贝数质粒。

产品内容

Component	CW2114M	CW2114L
	10 preps	25 preps
COWIN-tip 500	10 个	25 个
30 mL Syringes	2 x 5 sets	5 x 5 sets
RNase A (100 mg/mL)	220 μL	540 μL

CWBlue-A	110 μ L	270 μ L
Buffer RES	110 mL	270 mL
Buffer LYS	110 mL	270 mL
Buffer NEU	110 mL	270 mL
Buffer ETR	35 mL	80 mL
Buffer EQU	110 mL	270 mL
Buffer WASH	3 x 220 mL	4 x 400 mL
Buffer ELU	2 x 55 mL	3 x 90 mL
Endotoxin-free PW1 (Concentrate)	17 mL	44 mL
Endotoxin-free H ₂ O	24 mL	54 mL

自备试剂： 异丙醇、无水乙醇（室温）

自备耗材： 无热原吸头、无热原移液管和无热原手套

注意事项

- 第一次使用前，将RNase A溶液全部加入到Buffer RES中，混匀待用；或置于2-8℃长期保存，但需恢复至室温后再使用。
- 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Endotoxin-free PW1 (Concentrate) 中加入所示量的无水乙醇。
- 使用前请先检查Buffer LYS、Buffer NEU是否出现结晶或沉淀，若存在结晶或沉淀现象，可在37℃温浴至完全溶解。请勿剧烈晃动Buffer LYS，以免产生气泡。
- 皮肤切勿直接接触Buffer LYS和Buffer NEU，请带手套操作，用后应立即旋紧瓶盖。
- 实验操作前，Buffer NEU需置于冰上或2-8℃冰箱中预冷。
- 可选：** CWBlue试剂是一种颜色指示剂，用以指示整个操作的规范性，对操作人员健康与下游实验均无负面影响；客户可根据需求自主选择是否添加。
CWBlue的使用方法：请将试剂盒中全部CWBlue加入Buffer RES试剂瓶中，用力摇晃至CWBlue充分混匀。加入Buffer LYS并充分混匀后，溶液变得粘稠且呈现均一澄清的蓝色，则表明菌体细胞裂解充分；再加入Buffer NEU并充分混匀后，溶液不再粘稠，无任何蓝色残留，且漂浮有白色絮状物，表明中和复性反应充分。
- 细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素均会影响质粒得率和纯度。
- 对于低拷贝质粒的提取纯化，需根据菌体量（体积或湿重）按比例适度增加RES、LYS和NEU溶液的用量；当试剂盒中RES、LYS和NEU溶液不能满足实际用量时，客户可直接购买本公司的成品溶液和过滤柱（30 mL Syringes），也可咨询本公司溶液配方来自主配制所需溶液。
- 自备无内毒素或无热原吸头、移液管和试管用于洗脱或步骤11开始的操作。合格的耗材有利于质粒样本内毒素含量的控制。
- 建议在步骤9完成后，更换一次无热原手套。

操作步骤

样本处理:

1. 4 °C, $\geq 6,000 \times g$ 离心15 min, 收集150 mL过夜培养LB菌液中大肠杆菌细胞沉淀, 尽量弃尽上清残留液。

注意: 提取菌液量可参考附件。若此时需要中止实验, 需要将菌体沉淀保存在-20°C。

2. 加入10 mL Buffer RES (请先检查是否已加入 RNase A 以及 CWBlue (可选)), 使用移液器或涡旋振荡器充分悬浮细菌沉淀。

注意: 如果菌块未彻底混匀, 将会影响裂解效果, 使质粒得率和纯度偏低。

3. 加入10 mL Buffer LYS, 颠倒 8~10 次充分混合, 室温 (15-25 °C) 孵育 ≤ 5 min. 若使用 CWBlue 试剂, 溶液会变成蓝色。

注意: 温和混匀, 不要剧烈震荡, 以免打断基因组DNA, 造成提取的质粒中混有基因DNA片段。如果溶液未变得清亮, 提示可能菌量过大, 裂解不彻底, 应减少菌体量。加入溶液 Buffer LYS 至充分混匀后, 溶液变粘稠且呈现均一蓝色, 无明显白色悬浮物, 表明菌体细胞裂解充分。孵育时间不宜超过5min, 过度裂解易造成超螺旋质粒产量下降。Buffer LYS 用后立即旋紧 Buffer LYS 试剂瓶盖, 尽量避免溶液与空气中的 CO₂ 发生中和反应。

4. 孵育过程中, 将30 mL Syringes过滤柱出口盖上小帽并放在合适的试管或架子上。

5. 加入 10 mL 预冷 Buffer NEU, 立即用力颠倒混匀 8-10 次, 充分混匀至菌体裂解液中出现大量松散的豆花状白色漂浮物, 且不再呈现粘稠状态, 室温静置 5 min. 若使用 CWBlue 试剂, 则溶液将混匀至无残留蓝色。

注意: 使用预冷的溶液NEU更利于沉淀物的形成; 加入溶液NEU后应立即快速用力颠倒混匀, 避免产生局部沉淀; 溶液不再呈现粘稠状态, 并有松散的豆花状白色沉淀物漂浮, 表明中和复性反应充分。

6. 4 °C, $\geq 6,000 \times g$ 离心5 min, 小心将上清液全部倒入30 mL Syringes过滤柱中; 从过滤柱出口取下小帽, 轻轻地将推柄插入柱中, 将含质粒的细菌裂解液滤入50 mL管中。

注意: 请缓慢推动推柄过滤, 防止用力过大, 通常回收得到约27 mL清澈的裂解液。

可选方式 (快速过滤菌体裂解液): 可在步骤5完成中和反应后, 将细菌裂解液全部转入30 mL Syringes 筒中, 静置5min, 从过滤柱出口取下小帽, 轻轻地将推柄插入柱中, 将含质粒的细菌裂解液滤入50 mL管中 (可得到20-23 mL清澈的裂解液)。

7. 在上述滤液中加入 2.5-3 mL Buffer ETR (不少于滤液体积的1/10), 颠倒混匀8-10次, 冰浴30 min (期间颠倒混匀5~6次)。

注意: 添加 Buffer ETR后, 细菌裂解液会变得浑浊, 但在冰浴后再次变澄清。

质粒纯化:

8. 加入10 mL Buffer EQU至COWIN-tip 500柱筒中, 形成重力流, 至柱中溶液排尽。

注意: 由于平衡液EQU中的表面活性剂降低了溶液表面张力, 使得COWIN-tip 500柱中的溶液易于形成重力流, 进而便于完全排尽柱中溶液。

9. 将步骤7中冰浴后的溶液全部倒入COWIN-tip 500柱筒中, 形成重力流, 至柱中溶液排尽。

注意: Buffer ETR 的存在可能会导致裂解液再次变浑浊。但并不影响纯化过程。

*下列步骤开始前, 请使用无内毒素或无热原吸头、移液管和试管, 更换一次无热原手套。

10. 加入 30 mL Buffer WASH 至 COWIN-tip 500 柱筒中, 形成重力流, 至柱中溶液排尽。
11. 重复步骤 10 一次。
12. 加入 10 mL Buffer ELU 至 COWIN-tip 500 柱筒中, 用无内毒素或无热原离心管收集洗脱的质粒 DNA。
- 注意:** 如果质粒是低拷贝或长度为 45-50 kb 时, 可将洗脱液 ELU 预热至 65 °C 以增加质粒回收效率。
*若希望在此步骤完成后选择暂停, 可将洗脱样本存放于 4 °C, 但并不建议 4 °C 过夜存放。

质粒浓缩:

13. 向步骤12洗脱的质粒DNA中加入7 mL室温异丙醇 (Buffer ELU 溶液用量的 0.7 倍体积), 立即混合均匀; 并在4 °C 下, $\geq 15,000 \times g$ 离心30 min, 小心倒掉上清液。
- 注意:** 1) 异丙醇不要预冷, 以免产生过多的盐离子沉淀物。低温离心是为防止样本过热。
2) 沉淀物可能松散的附着在离心管壁上, 需小心去除上清液。
14. 向上述沉淀物中加入5 mL室温放置的Endotoxin-free PW1(请先检查是否已加入无水乙醇), $\geq 15,000 \times g$ 离心10 min。小心倒掉上清液, 避免触动沉淀。
- 注意:** 1) 加入Endotoxin-free PW1时应轻柔, 避免打散沉淀;
2) 去除上清液时, 动作应轻柔, 注意不要触碰质粒DNA沉淀, 避免沉淀损失, 导致质粒DNA得率降低。
3) 若离心后质粒DNA沉淀不紧实, 可根据实际需求适当延长离心时间。
15. 室温干燥质粒 DNA 沉淀至表面乙醇挥发完全 (约 5-10 min), 以除去残留的乙醇。
16. 将干燥好的质粒 DNA 重新溶解于适量 Buffer TE-EF 或 Endotoxin-free H₂O 中直接应用于下游实验或 -20 °C 保存备用。
- 注意:** 溶解质粒DNA沉淀用溶液可根据客户要求, 选择无内毒素级 (<0.005EU/mL) 的溶解液, 如 Buffer TE-EF 和 Endotoxin-free H₂O 等。

附推荐菌液量 (LB培养基) :

单次处理样本量应不超过下表中推荐的菌液样本体积或ODV值, 下表中ODV=OD₆₀₀×V, V为菌液量 (mL)。

质粒类型	推荐菌液量	最大ODV	预期产量
高拷贝质粒	100~150 mL	400	300~700 µg
低拷贝质粒	250~300 mL	1000	50~300 µg