



# Endofree Plasmid Mega Kit (Resin) 无内毒素质粒超量提纯试剂盒 (树脂法)

Cat. No. CW2115

## 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纯化需求。

阴离子交换树脂微球填充的预装层析柱 (COWIN-tip 2500), 可从 500 mL 的 LB 菌液中纯化制备 2.5 mg 转染级质粒 DNA, 适用于包括转染 (原代、敏感以及悬浮细胞)、显微注射和基因治疗等多种研究。

## 产品特点

1. COWIN-tip 2500 预装层析柱的质粒载量高达 3 mg;
2. 本产品制备的转染级质粒内毒素含量 < 0.05 EU/ $\mu$ g;
3. 通过重力流方式, 可在 2.5 小时内完成高纯度转染级质粒的制备;
4. 适用于提取纯化 3-50 kb 大小的不同拷贝数质粒;

## 保存条件

COWIN-tip 2500 和 COWIN-filter Mega Cartridges 在干燥室温 (15-30 °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 °C 可稳定保存 6 个月, 其他溶液和 RNase A 试剂可在室温 (15-30 °C) 下稳定保存 2 年。

## 产品内容

Component	CW2115M 5 preps
COWIN-tip 2500	5 sets
COWIN-filter Mega Cartridges	5 sets
RNase A (100 mg/mL)	540 $\mu$ L
CWBlue-A	270 $\mu$ L
Buffer RES	270 mL
Buffer LYS	270 mL
Buffer NEU	270 mL
Buffer ETR	80 mL
Buffer EQU	200 mL
Buffer WASH	5 x 220 mL
Buffer ELU	200 mL
Endotoxin-free PW1 (Concentrate)	17 mL
Endotoxin-free H <sub>2</sub> O	25 mL

## 自备试剂

异丙醇和无水乙醇（室温）

## 自备仪器与耗材

负压抽气泵（含连接管）、抽滤收集瓶、无热原试管、无热原吸头或移液管、和无热原手套。

## 注意事项（请在操作前仔细阅读）

1. 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°C 长期保存，但需恢复至室温后再使用。
2. 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。
3. 使用前请先检查 Buffer LYS 和 Buffer NEU 是否出现结晶或沉淀，若存在结晶或沉淀现象，可在 37°C 温浴至完全溶解。请勿剧烈晃动 Buffer LYS，以免产生气泡。
4. 皮肤切勿直接接触 Buffer LYS 和 Buffer NEU，请带手套操作，用后立即旋紧瓶盖。
5. 实验操作前，Buffer NEU 需置于冰上或 2~8°C 冰箱中预冷。
6. 可选：CWBlue-A 试剂是一种颜色指示剂，用可视化的方式监测溶液是否混合充分，以避免发生细胞裂解不充分以及 SDS、基因组 DNA 与细胞碎片沉淀不完全；对下游实验与操作人员健康无负面影响。客户根据需求自主选择是否添加。

CWBlue-A 的使用方法：请将试剂盒中 CWBlue-A 全部加入 Buffer RES 试剂瓶中，用力摇晃至 CWBlue-A 充分悬浮混匀。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。

7. 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 溶液不能满足实际使用量时，客户可直接购买本公司的成品溶液和过滤杯（COWIN-filter Mega Cartridges），也可咨询本公司获取溶液配方。
8. 细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小和拷贝数等因素均会影响质粒得率和纯度。
9. 从步骤 11 开始，使用自备的无热原吸头、移液管和试管用于洗脱等操作，合格的耗材可保证质粒样本内毒素含量的控制。
10. 建议从步骤 11 开始更换一次手套。

## 操作步骤

### 样本处理:

1. 4°C,  $\geq 6,000 \times g$  离心 15 min, 收集 500 mL 过夜培养的 LB 菌液中的大肠杆菌细胞, 尽量弃掉上清残留溶液。

注意: 提取菌液样本量可参考附件。若此时需中止实验, 需将菌体沉淀保存在-20°C待用。

2. 将 COWIN-filter Mega Cartridges 连接至适配的收集瓶上, 并轻轻压平过滤杯中的预过滤棉片, 连接负压抽气泵。

3. 向留有菌体沉淀的离心瓶中加入 50 mL Buffer RES, 用移液器或涡旋振荡器充分悬浮菌体沉淀。

注意: 1) 首先确认 Buffer RES 中已加入 RNase A。

若使用 CWBlue-A, 则在加入 Buffer RES 后, 使劲摇晃试剂瓶至 CWBlue-A 均一分散于溶液中。如果菌块未充分悬浮混匀, 将会影响裂解效果, 导致得率和纯度偏低。

4. 加入 50 mL 的 Buffer LYS, 用力颠倒 6 次, 轻柔混合充分, 室温 (15-25 °C) 孵育 5 min。若使用 CWBlue-A 试剂, 溶液会变成蓝色。

注意: 1) 温和混匀, 不要剧烈振荡, 以免打断基因组 DNA, 造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。

2) 若溶液未变得清亮, 提示可能样本量过大, 裂解不彻底, 应当适当减少菌体量。

3) 加入溶液 LYS 至混匀充分后, 溶液呈现均一蓝色, 无明显浑浊物, 则表明菌体细胞完全裂解。孵育裂解时间不宜超过 5 min。Buffer LYS 使用后, 应立即旋紧瓶盖, 尽量避免空气中的 CO<sub>2</sub> 与溶液发生中和反应。

5. 加入 50 mL 预冷 Buffer NEU, 立即上下用力颠倒混匀 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。若使用 CWBlue-A 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漂浮物, 表明中和复性反应充分。

6. 菌体裂解液全部倒入 COWIN-filter Mega Cartridges 滤杯中, 室温静置 10 min。

7. 打开负压抽气泵, 至液体完全滤入到收集瓶中, 关闭负压抽气泵, 并弃掉 COWIN-filter Mega Cartridges。

8. 向收集瓶内的滤液中加入 15 mL 溶液 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: 加入 Buffer ETR 后, 收集瓶内的滤液会变浑浊, 冰浴后会恢复澄清。

## 质粒纯化

9. 加入 35 mL Buffer EQU 至 COWIN-tip 2500 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 2500 柱中的溶液易于形成重力流, 进而便于完全排尽柱中溶液。

10. 将步骤8中冰浴后的溶液转入 COWIN-tip 2500 柱筒中, 形成重力流, 至柱中溶液排尽。

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

11. 用 200 mL Buffer WASH 漂洗 COWIN-tip 2500 柱, 至重力作用下柱中溶液排尽。

注意: 从步骤 11 开始, 所有后续步骤中, 请使用无内毒素和无热原吸头和离心管, 并更换一次手套。

12. 加入 35 mL 溶液 ELU 至 COWIN-tip 2500 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: 如果质粒拷贝数较低或质粒大小为 45-50 kb 时, 将洗脱缓冲液 ELU 预热至 65°C 可有效提升质粒回收率。

## 质粒浓缩

13. 向步骤12获得的质粒 DNA 中加入 24.5 mL 室温异丙醇 (异丙醇用量为 Buffer ELU 溶液体积的 0.7倍), 立即混匀; 4°C,  $\geq 15,000 \times g$  离心 30 min, 小心倒掉上清。

注意: 异丙醇不要预冷, 以免产生过多的盐离子沉淀。低温离心是为防止样本过热。沉淀物可能松散的附在离心管壁上, 去除上清液时需小心。

可选: 选用 V 型底离心管, 4°C,  $5000 \times g$  离心 60 min, 小心弃掉上清液。

14. 向上述沉淀物中加入 7 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 10-20 min), 用 Buffer TE-EF 或 Endotoxin-free H<sub>2</sub>O 溶解质粒 DNA, 直接应用于下游实验或 -20°C 保存备用。

### 附推荐菌液量 (LB培养基) :

单次样本处理量应不超过下表中推荐的菌液体积或 ODV 值, 下表中  $ODV=OD_{600} \times V$ ,  $V$  为菌液量 (mL)。摇床培养的 LB 菌液, 参考下表的推荐菌液量来决定处理的样本量; 若是发酵方式培养的菌液, 建议参考下表的推荐菌泥湿重决定处理的样本量。

质粒类型	推荐菌液量	推荐菌泥湿重	预期质粒产量
高拷贝质粒	500 mL	1.5 g	1.5-3.0 mg
低拷贝质粒	2.5 L	7.5 g	0.5-3.0 mg