

无内毒素高纯质粒大提试剂盒

KD407(10 次)

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10 次
RNase A (10mg/ml)	4°C	750µl
溶液 P1	4°C	77 ml
溶液 P2	室温	77 ml
溶液 N3	室温	77 ml
内毒素清除剂	-20°C	25 ml
去蛋白液 PE	室温	63 ml 第一次使用前请加入37ml无水乙醇
漂洗液 WB	室温	50 ml 第一次使用前请加入200ml无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
吸附柱 DC	室温	10 个
收集管 (50ml)	室温	10 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果

试剂盒储存:

1. RNase A , 内毒素清除剂 , 4°C保存 12 个月 , 长期保存放 - 20°C。
2. 第一次使用时 , 将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 4°C保存。如果 RNase A 失活 , 需要在溶液 P1 补加 RNase A (终浓度 100ug/ml) 。
3. 如果室温比较低 , 溶液 P2 中 SDS 可能会析出沉淀 , 可在 37°C水浴加热几分钟 , 不要剧烈摇晃。
4. 各溶液使用后应及时盖紧盖子 , 避免长时间和空气接触。

产品介绍

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，粗提物通过独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素，然后离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点

1. 本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法提取质粒，离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，试剂盒稳定性高。
2. 可以从 150-300 ml 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 0.5-2mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90 %。
3. 提取质粒内毒素含量极低（ <0.1 EU/ μ g DNA），细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

注意事项：

1. 试剂盒需要带50ml转头的台式离心机，转速在12000转，离心步骤均在室温完成（除非特别说明）。
2. 如果质粒为低拷贝质粒或大于10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加P1、P2、N3 的用量，洗脱缓冲液应在70°C预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
3. 得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD260值为1相当于大约50 μ g/ml DNA。电泳可能为单一条带，也可能为2条或者多条DNA条带，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不同造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等因素有关。产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%。
4. 处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳判断质粒大小。建议质粒通过酶切线性化后，在通过DNA marker 确定其质粒的大小。
5. 本试剂盒洗脱液EB不含有EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。质粒DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

- ⇨ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中分别加入指定量的无水乙醇, 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入。
 - ⇨ 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8°C 保存。
1. 取 150-200 ml (最多不超过 300 ml) 过夜培养的菌液, 12,000xg (约 10,000rpm), 离心 1 分钟, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。注意: 收集超过 50 毫升菌液, 可以离心弃上清后, 在同一个 50ml 管内加入更多的菌液, 重复步骤 1, 直到收集到足够的菌体。
 2. 用 7.5 ml 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。
 3. 加 7.5 ml 的溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解, 室温放置 4-5 分钟。温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免基因组 DNA 剪切断裂! 所用时不应超过 5 分钟! 以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。
 4. 加 7.5 ml 溶液 N3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。12,000 x g 离心 10-15 分钟, 小心取上清至新管, 避免吸到漂浮白色沉淀。加入溶液 N3 后应该立即混匀, 以免产生 SDS 的局部沉淀。
 5. 加入 0.1 体积(上清的体积的 10%, 约 2.4ml)的内毒素清除剂到上一步所得上清, 颠倒旋转混匀, 冰浴或者插入碎冰中(或冰箱冷冻室)放置 5 分钟直到浑浊变清亮透明(或仍旧稍有浑浊), 中间偶尔混匀几次。内毒素清除剂加入上清后, 上清会变得浑浊, 但是冰浴后应恢复清亮(或稍浑浊)。
 6. 常温放置 3-5 分钟, 温度恢复室温溶液很快变为浑浊, 颠倒混匀。如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42°C 水浴, 将很快变浑浊, 颠倒混匀。
 7. 室温 12,000 x g 离心 10 分钟分相。上层水相含 DNA, 下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管(注意不要吸到蓝色油状层, 里面含内毒素等杂质), 弃油状层。
 8. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇(约 11ml) 后充分颠倒混匀后分多次(每次不超过 10 ml, 因个别情

况下离心机转子倾角较大, 建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 ml, 以防产生漏液现象) 转入吸附柱 DC 中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 x g 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

9. 加入 10 ml 去蛋白液 PE (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 x g 离心 1 分钟, 弃掉废液。此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质, 如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株, 核酸酶含量丰富, 应加此步骤; 如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5 α 等缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 则可略过此步骤。
10. 加入 10 ml 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 x g 离心 1 分钟, 弃掉废液。再加入 10ml 漂洗液 WB, 重复漂洗一次。
11. 将吸附柱 DC 放回空收集管中, 12,000 x g 离心 3 分钟以干燥基质膜上残留乙醇。打开盖子室温晾干 2-3 分钟。该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇, 残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率, 降低质粒产量。
12. 取出吸附柱 DC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 1-2 ml 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热可提高产量), 室温放置 2 分钟, 12,000 x g 离心 1-2 分钟。推荐: 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 1 分钟, 12,000 x g 离心 1-2 分钟。洗脱两遍可提高浓度约 10%。洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量 (最小不应少于 1ml)。

推荐质粒浓缩步骤:

1. 将质粒 DNA 分装到 3 个 2 ml 离心管中, 在每个离心管中加入 0.1 个质粒 DNA 溶液体积的 3M 乙酸钠 (pH 5.2) 和 0.8 个质粒 DNA 溶液体积的异丙醇, 混合均匀, 13000 rpm 离心 10 分钟。
2. 弃尽上清, 保留管底 DNA 沉淀。每管加入 1.5 ml 70% 乙醇, 旋涡震荡悬浮沉淀, 13000 rpm 离心 5 分钟。* 注意勿丢弃管底的质粒 DNA 沉淀。
3. 弃尽上清, 超净台上室温干燥质粒 DNA 沉淀 10 分钟。
4. 每管加 100 μ l 去离子纯水, 旋涡震荡以充分溶解质粒 DNA 沉淀, 将质粒 DNA 储存于 -20°C 备用。