

## 无内毒素质粒中量快速提取试剂盒 (离心柱法)

**KD410**      20次

### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KD410
RNase A ( 10 mg/ml )	-20°C	500 µl
平衡液	室温	10 ml
溶液 P1	4°C	50 ml
溶液 P2	室温	50 ml
溶液 N3	室温	50 ml
内毒素清除剂	-20°C	18 ml
去蛋白液 PE	室温	40 ml 第一次使用前加入 25ml 乙醇
漂洗液 WB	室温	25 ml 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
吸附柱 MC ( 5 ml )	室温	20 个
收集管 ( 15 ml )	室温	20 个

本试剂盒在所需温度储存 12 个月不影响使用效果。

### 储存事项:

1. RNaseA 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输, 收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放 -20°C。内毒素清除剂 4°C 保存 12 个月, 长期保存 -20°C
2. 第一次使用时, 可将试剂盒所带全部的 RNaseA 加入溶液 P1 后 (终浓度 100µg/ml) 置于 4°C 保存。

如果溶液 P1 中 RNaseA 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNaseA 即可。

3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。

## 产品介绍：

采用优化的碱裂解法配合硅胶膜吸附技术特异性结合质粒，独有的内毒素清除剂溶液系统去除了杂质、蛋白和内毒素，用于常规的 PCR，酶切，测序，转化等实验外，还可以直接用于原生质体转染和真核细胞转染等实验。

## 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速从 30-70 ml 大肠杆菌 LB (Luria-Bertani) 培养液中，可快速提取 100-500 $\mu$ g 纯净的高拷贝质粒 DNA。
3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低（小于 0.1EU/微克 DNA）

## 注意事项：

1. **所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成**，使用转速可以达到 8,000  $\times$ g (约 9,000 rpm)，带 15 ml 以上转头的台式离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提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。
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 $\mu$ 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一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。**

4. **质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后**，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。

### 操作步骤：

第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶中按标签指示加入无水乙醇，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 RNaseA 全部加入溶液 P1 中，混匀。每次使用后置于 2-8°C 保存。

1. 取 30-50 ml（最多不超过 75 ml）过夜培养的菌液加入 50 ml 离心管，8,000 ×g（约 9,000 rpm），离心 1 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。如使用 15 ml 离心管，可以离心弃上清后，在同一个 15 ml 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. 加 2.3 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 2.3 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 min。**温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 min！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 2.3 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。8,000 ×g 离心 10 min，小心吸取上清至新管，避免吸取到漂浮的白色沉淀。加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。**如有漂浮白色沉淀，可用吸头撇开浮沫伸入液面下吸取，偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果，后续过滤漂洗过程中都会去除。**
5. 柱平衡：向吸附柱 MC 中加入 0.5 ml 平衡液，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，备用。**平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。**
6. 将步骤 4 新管中吸取上清加入 0.1 倍体积的内毒素清除剂，混匀后，冰浴（或放入冰箱冷冻室）5 min 直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间可以充分颠倒混匀 1 次。内毒素清除剂加入上清后，可能会短暂浑浊，但是冰浴后应恢复清亮（或稍浑浊）。

7. 常温放置 3-5 min，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。如室内温度较低或想加快速度可以在 37-42°C 水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
8. 室温 8,000 ×g 离心 10 min 分相。上层水相含质粒 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。
9. 向得到的上清中加入 0.5 倍体积异丙醇（约 3.3ml）后充分颠倒混匀后，分多次转移混合液至吸附柱 MC 中，8,000×g 离心 1min，弃滤液。**个别情况下离心机转子倾角较大，建议每次加入吸附柱的溶液体积为 3.5 ml（不超过，以防产生漏液现象）。直到所有混合溶液通过此吸附柱。**
10. 加入 3 ml 去蛋白液 PE（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。

**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 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。**

11. 加入 3 ml 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。再加入 3 ml 漂洗液 WB，重复漂洗一次，弃滤液。
12. 将空吸附柱放回收集管中，8,000 ×g 离心 3 min 以干燥基质膜上残留乙醇。**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降低洗脱效率，降低质粒产量。**
13. 将吸附柱置于新的 15 ml 离心管中，室温晾干 2-3 min，**在吸附膜的中间部位加 0.5 ml（可在 0.3 ml-0.6 ml 变化）洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-75°C 水浴中预热可提高产量），室温放置 3 min，8,000 ×g 离心 1min，弃吸附柱。**

**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 min，8,000 ×g 离心 1 min。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 0.3 ml）。**