

无内毒素高纯质粒小量快速提取试剂盒

KD402 100次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次	100 次
平衡液	室温	5ml	10ml
RNase A (10mg/ml)	4°C	150µl	250 µl
溶液 P1	4°C	15ml	25 ml
溶液 P2	室温	15ml	25 ml
溶液 N3	室温	15ml	25 ml
去蛋白液 PE	室温	16ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	32ml
漂洗液 WB	室温	13 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	25ml
内毒素清除剂	4°C	5ml	10ml
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml	15ml
吸附柱 AC 和收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. RNase A 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。
2. 内毒素清除剂常温运输, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放 - 20°C。
3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀, 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。

4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品介绍:

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞, 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, 再通过去蛋白液和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. 离心吸附柱内硅基质膜采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。
2. 独特工艺配方清除内毒素, 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

- ⇒ 第一次使用前请在去蛋白液, 漂洗液 WB, 去蛋白液 PE 中加入指定量无水乙醇, 充分混匀。
 - ⇒ 第一次使用时, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 2-8°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
1. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机。
 2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒, 建议接种单菌落于1.5-4.5 ml 加合适抗生素的LB培养基, 过夜培养14-16个小时, 可提取出多达20 μ g的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10kb的大质粒, 应当加大菌体使用量, 使用5-10 ml过夜培养物, 同时按比例增加 P1、P2、P3的用量, 其它步骤相同。
 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。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。处于环状或者超螺

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。

5. 洗脱液EB不含有螯合剂EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保pH大于7.5，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在 - 20°C。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），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

关于平衡液的使用

1. 介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37°C使沉淀完全消失。
2. 使用方法：取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100μl 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

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 和去蛋白液 PE 瓶中加入指定量无水乙醇，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1.5-4.5 ml过夜培养的菌液，12,000rpm离心30秒，尽可能的倒干上清，收集菌体。收集超过1.5 ml 菌液，离心弃上清后，在同一个1.5ml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250μl溶液P1重悬菌体沉淀，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250μl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！所用时间不应超过5分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘

稠, 如果菌体少, 很快清亮粘稠后就可以做下一步, 不是一定要准确的5分钟。

4. 加350 μ l溶液N3, 立即温和地上下翻转6-8次, 充分混匀时会出现白色絮状沉淀12,000rpm离心10分钟, 小心取上清至新管, 避免吸取到漂浮白色沉淀。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80 μ l)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。
7. 室温12,000 rpm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. 平衡液预处理吸附柱: 使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤, 具体参见前文“关于平衡液的使用”。
9. 向上层水相中加入0.5体积异丙醇(约370 μ l)后充分颠倒混匀后分两次转入吸附柱AC中(吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm离心1分钟(先加650 μ l离心, 弃废液, 再加入剩余的溶液, 再次离心), 倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
10. 加入500 μ l去蛋白液PE, 12,000 rpm 离心30秒, 弃废液。
11. 加入600 μ l漂洗液WB(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心30秒, 弃掉废液。
12. 重复步骤11一次
13. 将吸附柱AC放回空收集管中, 12,000rpm离心2分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
14. 取出吸附柱AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加50-100 μ l洗脱缓冲液EB(洗脱缓冲液事先在65-70 $^{\circ}$ C水浴中加热效果更好), 室温放置2分钟, 12,000rpm 离心1分钟。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心1分钟。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, 但是最小体积不应少于30 μ l, 体积小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。