

无内毒素质粒小量中提试剂盒

货号：DP103-01

规格：50次

保存：15-25℃

【产品概述】

本试剂盒采用改良的SDS-碱裂解法，结合硅胶膜吸附技术，使质粒 DNA 获得高效、专一的吸附。特有的内毒素清除剂高效清除内毒素，细胞转染效果极佳。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，通过漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后硅基质膜在低盐、高pH值的洗脱缓冲液的作用下得到纯净质粒DNA。可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等常规分子生物学实验。

【产品组分】

货号	组分	体积
DP103-100	平衡液（室温）	5ml
DP103-101	P1溶液（4℃保存）	25 ml
DP103-102	P2溶液（室温）	25 ml
DP103-103	N3溶液（室温）	25 ml
DP103-104	漂洗液WB（室温）（初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀）	13 ml
DP103-105	洗脱缓冲液EB（室温）	15 ml
DP103-106	去蛋白液PE（室温）（初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀）	16 ml
DP103-107	RNase A 溶液（4℃ 12个月，-20℃长期保存）	250 μl
DP103-108	内毒素清除剂（-20℃保存）	10 ml
DP103-109	吸附柱&收集管（室温）	50 套

【保存条件】

室温（15-25℃）保存，有效期12个月。不同组分按照说明保存。

【注意事项】

1. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒过夜培养14-16小时，5-15ml培养物可提取出高达30-90μg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，应适当加大菌体使用量，同时按比例增加P1、P2、N3的用量，其它步骤相同。
2. 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 μg/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。正常操作基本超螺旋可以超过90%。
3. 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。
4. 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℃。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。
5. 环境温度低时溶液P2中SDS可能会析出，如果出现浑浊或者沉淀，可在37℃水浴几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。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。

【实验准备】

1. 所有的离心步骤如未加说明均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm转速的离心机。
2. 首次使用时，将试剂盒所带全部的RNase A加入溶液P1中，混匀后置于4℃保存。

- 首次使用时，请先在漂洗液WB瓶中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时标注，以免多次加入。

【平衡液使用介绍】

核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/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℃使沉淀完全消失。

使用方法：取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取100 μl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】

- 取5-15 ml毫升过夜培养的菌液，9,000rpm离心1-2分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
- 用500 μl溶液P1重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮，全部转入一个2ml离心管。
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。
- 加500 μl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。
- 加500 μl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。13,000rpm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0.1体积(上清的体积的10%，约160μl)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)。
- 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。如室内温度较低可在37-42℃水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
- 室温14,000 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。

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，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

- 向上层水相中加入0.5体积异丙醇(约740μl)后充分颠倒混匀后分多次(每次不超过700μl)转入吸附柱AC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。
- 加入500μl去蛋白液PE，12,000rpm离心30秒，弃废液。
如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。
- 加入600 μl漂洗液WB(请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 g离心30秒，弃掉废液。再加入600 μl漂洗液WB，重复漂洗一次。
- 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。
- 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100-200 μl洗脱缓冲液EB(洗脱缓冲液事先在65-70℃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，室温放置2分钟，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100 μl，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。