

## 无内毒素质粒大量提取试剂盒

货号：DP104-01

规格：10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。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，提取率高于80%。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
DP104-101	P1溶液（4℃保存）	77ml
DP104-102	P2溶液	77 ml
DP104-103	N3溶液	77 ml
DP104-104	漂洗液WB（初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀）	50ml
DP104-105	洗脱缓冲液（EB）	20 ml
DP104-106	去蛋白液PE（初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀）	63 ml
DP104-107	RNase A 溶液（10 mg/ml，4℃保存）	750 μl
DP104-108	内毒素清除剂（-20℃长期保存）	25ml
DP104-109	吸附柱&收集管	10套

### 【保存条件】

室温（15-25℃）保存，有效期一年。不同组分按照说明保存。

### 【注意事项】

- 首次使用时，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℃保存。如果溶液P1中RNase A失活，提取的质粒可能会混有微量RNA残留，在溶液P1中补加RNase A即可。
- 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】

- 首次使用前请在漂洗液WB瓶中分别加入指定量的无水乙醇，充分混匀，加入后请及时标记，以免重复。
- 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12,000 x g，带50 ml转头的台式离心机。
- 提取的质粒量与细菌培养浓度、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，洗脱缓冲液应在70℃预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
- 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%。
- 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。

6. 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。

#### 【操作步骤】

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。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。  
不要剧烈震荡，以免基因组DNA剪切断裂，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℃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，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℃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）。

#### 【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。