

高纯度质粒中量提试剂盒

货号：DP102-01

规格：20次

【产品概述】

本试剂盒采用改良的碱裂解法，结合硅胶膜吸附技术，使质粒 DNA 获得高效、专一的吸附。通过漂洗液将杂质、蛋白和大部分内毒素成分去除，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、原生质体转染等一般的转染实验。

【产品组分】

| 货号 | 组分 | 体积 |
|-----------|---------------------------------|--------|
| DP102-100 | 平衡液（室温） | 10 ml |
| DP102-101 | P1溶液（4℃保存） | 50 ml |
| DP102-102 | P2溶液（室温） | 50 ml |
| DP102-103 | N3溶液（室温） | 50 ml |
| DP102-104 | 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） | 25 ml |
| DP102-105 | 洗脱缓冲液EB（室温） | 20 ml |
| DP102-106 | 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） | 40 ml |
| DP102-107 | RNase A 溶液（4℃ 12个月，-20℃长期保存） | 500 μl |
| DP102-108 | 吸附柱&收集管（室温） | 20 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。

【产品特点】

本产品不需要使用苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速、方便，从30-70 ml大肠杆菌LB（Luria-Bertani）培养液中，可快速提取100-500 μg纯净的高拷贝质粒DNA。

【注意事项】

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. 第一次使用时，可将试剂盒所带全部的RNase A加入溶液P1后（终浓度100 μg/ml）置于4° C可保存3个月左右。如果溶液P1中RNase A时间较久失活了，提取的质粒可能有微量RNA残留，在溶液P1中补加RNase A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，重新混匀，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
4. 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 ×g（约9,000 rpm），带15 ml以上转头的台式离心机。
5. 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。
6. 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。正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%。
7. 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】

提示：1) 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，加入后请及时标记，以免重复加入！

2) 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。

注：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。

注：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。

注：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。

注：1) 加入溶液N3后应该立即混匀，以免产生SDS的局部沉淀。

2) 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：**向吸附柱中加入0.5 ml平衡液，8,000 ×g 离心1 min，弃滤液，备用。

注：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. 向第4步得到的上清中加入0.5倍体积异丙醇（约3 ml）后充分颠倒混匀后，分多次转移混合液至吸附柱中，8,000 ×g离心1 min，弃滤液。

注：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。

7. 加入3 ml去蛋白液PE（**请检查是否已加入无水乙醇**），8,000 ×g离心1 min，弃滤液。

8. 加入3 ml漂洗液WB（**请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。

9. 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。

注：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。

10. 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1 min，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%。

注：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）。

【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。