

无内毒素质粒小量中提试剂盒

货号：DP103-01

规格：50次

【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）	10 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（4℃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。

3. 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°C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 μ l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】

1. 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。

2. 用500 μ l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。

3. 加500 μ l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, 如果很浑浊, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。

4. 加500 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。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。

5. **柱平衡:** 向吸附柱中加入100 μ l平衡液, 12,000 rpm 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. 加入0.1体积(上清的体积的10%, 约160 μ l)的内毒素清除剂到上一步所得上清, 颠倒旋转混匀。

7. 向上一步得到的混合物中加入0.5体积异丙醇(约740 μ l)后充分颠倒混匀后分多次(每次不超过750 μ l)转入吸附柱中(吸附柱放入收集管中), 12,000 x g离心30秒, 倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

8. **可选做步骤:** 加入500 μ l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XL-1 Blue、Top10和DH5 α 等endA缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 可省略此步骤。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, 残留核酸酶可能导致质粒降解或者下游酶切时候切散, 应做此步骤。

9. 加入600 μ l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 μ l漂洗液WB, 重复漂洗一次。

10. 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。

11. 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 μ l洗脱缓冲液EB(洗脱缓冲液事先在65-70°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, 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 μ l, 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。