

溶液型质粒大量提取试剂盒

货号：DP106-01

规格：20次

保存：15-25℃

【产品概述】

本产品用碱裂解法从培养菌中提取质粒DNA，采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂，只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA等杂质，获得高质量的质粒DNA。纯化DNA的OD_{260/280}通常在1.8左右，得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对DNA纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在1.5ml小离心管中操作，方法简单，不需特殊设备，无需过柱，不用酚氯仿抽提；回收细菌裂解释放出的质粒很完全，不必担心质粒DNA的丢失。本方法提取纯化质粒DNA，对质粒损伤小，对于10 kb以上的大型质粒或超大型BAC/PAC质粒，只要碱裂解法能够提取，即可做到有效纯化。可选择任意小体积溶解质粒，浓度可高达5 μg/μl。超螺旋比例可高达95%，无内毒素，转染效果好。

【产品组分】

货号	组分	体积
DP106-101	P1溶液（4℃保存）	130 ml
DP106-102	P2溶液	100 ml
DP106-103	P3溶液	100 ml
DP106-104	杂质清除剂A液	3 ml
DP106-105	杂质清除剂B液	30 ml
DP106-106	内毒素清除剂（4℃保存）	10 ml
DP106-107	RNase A 溶液（10 mg/ml，4℃保存）	1.3 ml

【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。

【产品特点】

- 1、不需要使用苯酚，氯仿，也不需要乙醇沉淀。
- 2、快速、方便，从150-200 ml大肠杆菌LB培养液中，可快速提取0.5 mg -2 mg纯净的高拷贝质粒DNA，提取率达 80-90%。
- 3、获得的质粒产量高、浓度高、超螺旋比例高、纯度高，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。
- 4、内毒素含量极低（< 0.1 EU/μg DNA），可直接应用于细胞转染。

【注意事项】

- 1、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℃保存三个月左右。如果溶液P1中RNase A失活，提取的质粒可能会混杂有微量RNA残留，在溶液P1中补加RNase A即可。
- 2、环境温度低时P2溶液中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。
- 3、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、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、P3的用量。
- 2、提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪大了开口的吸头，防止机械剪切对DNA的损坏。

- 3、DNA沉淀液沉淀离心后，可能看不到明显沉淀。如未见沉淀，担心DNA丢失，可保留上清液，待完成全部操作后电泳鉴定，以确定是否获得终产物（数百微克DNA离心沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块）。
- 4、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。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过95%。
- 5、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，无法通过电泳知道确切大小。

【操作步骤】

提示：将RNase A全部加入溶液P1中，混匀，使用后置于2-8 $^{\circ}$ C保存。

- 1、取150 ml（最多不超过180 ml-220 ml）过夜培养的菌液装入合适离心瓶，8,000 \times 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50 ml离心管，可以离心弃上清后，在同一个50 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、加入 5 ml P1溶液，充分混悬震荡菌体沉淀，使其完全分散开，至无絮块存在。室温放置3~5 min。
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、加入5 ml P2溶液，轻轻颠倒离心管6~8次，室温放置5 min，使细菌完全裂解，溶液透明。
注：温和地混合，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。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
注：P2溶液时间长了可能裂解效率降低，如碰到不明原因提取质粒产量降低，尝试新鲜配制P2溶液（P2溶液配方：1% SDS，0.2 M氢氧化钠）可能提高产量。
- 4、加入5 ml溶液P3溶液，立即颠倒离心管6~8次，充分混匀，至白色絮状物产生。上述裂解液于 12,000~16,000 \times g离心10~15 min，小心吸出上清，移入新的50 ml离心管中。
注：加入P3溶液后应该立即混匀，以免产生SDS的局部沉淀。
注意：使用异丙醇沉淀，蛋白杂质和盐离子共沉淀较少，可能看不到明显的较大团块沉淀，但是质粒还是可以完全沉淀下来，不影响实际的质粒产量。如果你习惯看见较大的沉淀团块操作，可以选择2倍体积的无水乙醇沉淀。
- 5、加入10 ml 异丙醇，颠倒离心管，充分混匀。
- 6、12,000~16,000 \times g离心10 min，小心弃去上清，倒置于吸水纸上轻轻沥干残余液体，加入3~5 ml 70%乙醇漂洗一遍，最高速离心5分钟，弃上清，晾干沉淀。
注：DNA沉淀如果干燥过头，DNA将无法完全溶解，但是如果乙醇没有晾干挥发干净，残留太多，也会造成DNA无法完全溶解。
注意：异丙醇离心沉淀后，质粒纯度很高吸附在管底和侧壁可能看不见沉淀，但是不影响产量，后续步骤仔细吹打管底和沉淀所在的侧壁清洗溶解质粒。
- 7、加入1.4 ml P1溶液完全溶解沉淀团块，注意附着在管底和侧壁上的质粒沉淀虽然可能看不见，也要吹打管底和沉淀所在的侧壁清洗下来（大质粒可用宽口吸管轻轻吹打）。然后将质粒溶液转入2个新的1.5 ml离心管中（每个700 μ l）。
注：可选步骤（一般不需要）：如果菌株RNA丰富有微量RNA残留，可在此步骤后将质粒溶液 60 $^{\circ}$ C孵育15 min消化RNA。
- 8、加入55 μ l杂质清除液A，颠倒充分混匀后加入约**0.1体积(约80 μ l)冰预冷的内毒素清除剂**，颠倒旋转7~10次（30 sec左右）充分混匀，冰浴或者冰上放置 \geq 5 min，中间偶尔颠倒混匀几次。
注：内毒素清除剂加入上清后，上清可能变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮。
注意：如果不需要去内毒素用于转染，可在此步骤只加入55 μ l杂质清除液A，充分混匀后冰上放置5 min，离心后小心取上清转入一个新管，直接接步骤11。
- 9、42 $^{\circ}$ C水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后42 $^{\circ}$ C温育5 min。
- 10、室温14,000 \times g离心5 min分相（温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少20 $^{\circ}$ C以上室温离心或者保证冬季转头温度20 $^{\circ}$ C以上）。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。
注：溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤9-10。

- 11、将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除液B（约750 μl ），轻柔混匀， $14,000 \times g$ 离心10 min，弃上清（注意不要丢失DNA），轻轻加入1 ml 70%乙醇洗涤，离心弃上清，共两次，室温倒置晾干5~10 min使乙醇完全挥发。
- 12、加适量TE或者纯水（100~200 μl ）溶解沉淀（可在37°C水浴中振荡以辅助溶解）。要注意很多质粒DNA可能附着在离心管侧壁上，即使看不见，也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒DNA。
注：最后沉淀可以根据需要选择任意小体积溶解，这样可以得到很高浓度的转染级质粒DNA（高达5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）。如果有需要，客户也可以选择更大体积溶解。

【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。