

高纯度质粒大量快速提取试剂盒



产品信息:

试剂盒组成	保存	DP107-01 10次
平衡液 BL	室温	15ml
RNase A (10mg/ml)	-20℃	1ml
溶液 P1	室温	100ml
溶液 P2	室温	100ml
溶液 P3	室温	100ml
3M 乙酸钠	室温	1ml
去蛋白液 PD	室温	100ml
漂洗液 WB	室温	25ml×2 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AC	室温	10个
收集管 (50ml)	室温	10个

保存条件: 收到本产品后按照上面指示温度存放各成份, 储存 18 个月不影响使用效果。

产品介绍:

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞, 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, 再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除, 最后通过低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 从 100-200ml 大肠杆菌 LB 培养液中, 可快速提取 0.2-0.5mg 高质量的高拷贝质粒 DNA, 提取率达 80% 左右。
3. 获得的质粒产量高、超螺旋构象比例高、纯度好, 可以直接用于酶切、转化、PCR、

体外转录和测序等各种分子生物学实验。

注意事项:

- 1.第一次使用时,将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后(终浓度 100 μ g/ml)置于 4 $^{\circ}$ C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活,提取的质粒可能会有微量 RNA 残留,在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 2.环境温度低时溶液 P2 中 SDS 会析出出现浑浊或者沉淀,可在 37 $^{\circ}$ C 水浴加热几分钟,即可恢复澄清,不要剧烈摇晃,以免形成大量的泡沫。
- 3.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
- 4.溶液 P3 和去蛋白液 PD 中含有刺激性化合物,操作时要戴乳胶手套,避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤或眼睛时,要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 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、P3 的用量,洗脱缓冲液应在 70 $^{\circ}$ C 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间,提高提取效率。
- 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 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 90%。
- 7.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-20 $^{\circ}$ C。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。

自备试剂: 无水乙醇

操作步骤:

提示:

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定无水乙醇,充分混匀,加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇,以免多次加入!
- ⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中,混匀。每次使用后置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。
- ⇒ 将溶液 P3 放在冰上预冷。

- 1.柱平衡步骤:向吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中)加 1ml 平衡液 BL, 12,000rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理柱子)
- 2.取 100-300ml 过夜培养的菌液, 12,000rpm 离心 3 min, 尽可能的倒干上清, 收集菌

体。

3.用 10ml 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。

4.加 10ml 溶液 P2，温和地上下翻转 4 -7 次使菌体充分裂解，室温放置 4 min。

5.加 10ml 溶液 P3，立即温和地上下翻转 4 -7 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。冰上静置 5 min，4℃条件下 12,000rpm 离心 10 min，小心取上清，避免吸取到漂浮的白色沉淀。

6.取上清加入新的离心管（自备）中，向上清中加入 11 ml 异丙醇，上下颠倒混匀。

7.将上一步 6 中的混合溶液加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），静置 2 min，12,000rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液。

注意：吸附柱的最大容积为 15ml，所以第 5 步中所得溶液分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10ml，以防发生漏液现象。

8.加入 10ml 去蛋白液 PD，12,000rpm 离心 2 min，弃掉废液。

9.加入 10ml 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000rpm 离心 2 min，弃掉废液。

10.重复操作步骤 9。

11.将吸附柱 AC 放回空收集管中，最高速（最好大于 12,000rpm，如果离心机转速低，需要相应延长离心时间）离心 5 min，去除基质膜上的乙醇残留，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温或者烘箱晾干几分钟。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

12.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 1ml 洗脱缓冲液 EB（事先在 65-70℃水浴中预热效果更好），室温放置 2 min，12,000rpm 离心 5 min。需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 2 min。（**注意：洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.5-8.0 围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量的多少主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定。洗脱缓冲液体积不少于 1 ml，体积过小影响回收效率。DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。**）

可选步骤（如果需要更高浓度的质粒，可进行如下操作）：

13.上述 1ml 洗脱液分两管，每 0.5 ml 洗脱液加入 1 ml 无水乙醇以及 50μl 3M 乙酸钠，混匀，-20℃放置 1 小时，12,000 rpm 离心 10 min，小心弃上清。

14.加入 0.5 ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，室温 12,000 rpm 离心 5 min，小心弃乙醇。

15.重复操作步骤 14。

16.空气中干燥沉淀约 5-10 min，根据需要适当体积（一般 100μl）的缓冲液 EB 溶解沉淀。

BM200101