

## 无内毒素质粒大提试剂盒（转染级）

目录号：NG223 10次

试剂盒组成	保存	10次
RNaseA (10mg/ml)	室温	60mg
溶液P1	室温	120ml
溶液P2	室温	120ml
溶液N3	室温	60ml
内毒素清除剂	室温	25 ml
平衡液	室温	30ml
漂洗液PE	室温	60ml
漂洗液WB	室温	50ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液EB	室温	20ml
注射器 (20ml)	室温	10
吸附柱D8	室温	10
50ml收集管	室温	20

**储存条件：**本试剂盒在室温储存12个月不影响使用效果。

### 储存事项：

- 第一次使用时，将试剂盒所带全部的RNase A加入溶液P1（加入1ml P1至RNase A干粉中，吸打10次至粉剂完全溶解，然后全部加入P1中）置于4℃保存，有效期3-5个月。
- 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。
- 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℃水浴加热几分钟，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。

### 产品介绍：

本试剂盒采用改进SDS-碱裂解法裂解细胞，粗提物通过独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素，然后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，再通过漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、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：

快速，方便，从150-200 ml大肠杆菌LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取0.2-1.5mg纯净的高拷贝质粒DNA，提取率达80-90%。独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低（<0.1 EU/μg DNA），细胞转染效果极佳。本品采用独特的溶液体系可处理各种质粒载体（包括高中低拷贝，大型质粒，如BCA,cosmid等）也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

### 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

**提示：**第一次使用前请先在漂洗液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℃保存。

1. 取150-200 ml过夜培养的菌液（16-18小时），8000rpm，离心2-3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. 加9 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，静置10分钟。

**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9 ml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。

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。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 加4.5ml溶液N3，立即温和地上下翻转10-20次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。8000rpm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. 取出注射器活塞，把第4步离心后的上清全部倒入注射器中，把活塞的出水口对准已准备好的50ml离心管（自备）把活塞插入注射器使裂解液过滤到50ml离心管中，

#### 内毒素清除步骤：

1) 加入0.1倍体积的内毒素清除剂，颠倒混匀，冰浴10分钟，

2) 42-50°C水浴5分钟，8000rpm离心10分钟

3) 小心从离心机里取出样品时，避免下层内毒素结合液再次溶解，把上清全部转移到新的50ml离心管中，

6. 加入1/3倍体积的异丙醇至上清中，颠倒混匀6-8次，静置2分钟。

#### 关于平衡液的使用：

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2.5ml的平衡液至柱子中。静置2分钟，8000rpm离心3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。

7. 将第6步混合液分次（10-15ml）加入吸附柱D8中，直至混合液全部转移到吸附柱里并离心，弃废液。

**可选步骤：**加入5ml漂洗液PE 8000rpm离心3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DH5α等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

8. 将吸附柱D8放回空收集管中，加入10ml漂洗液WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），8000rpm离心3-5分钟，弃掉废液。再加入10ml漂洗液WB，重复漂洗一次。

9. 将吸附柱D8放回空收集管中，最高速（最好大于8,000rpm）离心3分钟以干燥基质膜上残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，打开盖子室温晾干3-5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。**

10. 取出吸附柱D8，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（洗脱缓冲液事先在65-70°C水浴中预热可提高产量），室温放置3分钟，8,000rpm离心3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）。**

#### 质粒浓缩(低浓度的质粒)

1. 每1倍洗脱液，加入1倍异丙醇和0.1倍的溶液N3，颠倒混匀，室温静置5min，13,000 rpm离心10min。

2. 弃上清，加入1.0ml的70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm离心5min。

3. 弃上清，加入1.0ml的70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm离心5min。

4. 弃上清，空气干燥沉淀5-10min,根据需要体积溶解沉淀。