

## 快捷型无内毒素质粒大提试剂盒

目录号: NG217 10次

试剂盒组成	保存	10次
平衡液	室温	30ml
RNaseA (100mg/ml)	室温	1ml
溶液 P1	室温	100ml
溶液 P2	室温	100ml
溶液 P4	室温	100ml
漂洗液 PB	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 置于 4°C 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°C 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, 粗提物通过特殊处理的溶液 P4 和过滤柱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 150-200ml 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 %。独特过滤柱系统配合特殊的溶液 P4 工艺清除内毒素, 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 RNaseA 全部加入溶液 P1 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8°C 保存。

1. 柱平衡步骤: 向吸附柱中 (吸附柱放入 50ml 收集管中) 加入 2.5ml 的平衡液, 8,000 rpm (~8,228×g) 离心 2 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

(选做步骤, 用平衡液处理过的柱子最好立即使用)。

2. 取 100ml-150ml (低拷贝 200ml-250ml) 过夜培养的菌液加入离心管, 8,000 rpm 离心 3min 收集细菌, 弃上清。

3. 加入 10ml 溶液 P1 (请先检查是否已加入 RNase A), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮沉淀。

注意: 请务必彻底悬浮细菌沉淀, 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解效果, 导致提取量和纯度偏低。对于低拷贝质粒, 加大菌体用量的同时按比例增加 P1、P2、P4 的用量。RNaseA 在溶液 I 中的终浓度为 100ug/ml。

4. 加入 10ml 溶液 P2, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 使菌体充分裂解, 室温放置 5min。

注意：温和地混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，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。

5.向离心管中加入 10ml 溶液 P4 立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置 5-10min 左右。8,000rpm 离心 10min,加入溶液 P4 后应立即混匀，避免产生局部沉淀。

6.将步骤 5 的离心上清全部溶液转移至注射器（质粒提取用内毒素吸附过滤柱）中，请避免倒入大量沉淀而阻塞注射器，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的 50ml 的管中。

注意：如果离心后倒入注射器溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多 (>100 ml)，推荐延长离心时间至 20-30min。

7.收集下滤液向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇（加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染），上下颠倒混匀后转移到吸附柱中（吸附柱放入 50ml 收集管中）。

注意：过滤后滤液会损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱的最大容积为 20ml，所以需要分多次过柱。个别情况下离心机转子倾角较大，此时，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 15 ml，以防产生漏液现象。

8.8,000rpm 离心 2min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：将第 7 步中所得溶液分多次过柱，每次均按以上条件操作。

9.向吸附柱中加入 5ml 漂洗液 PB，8,000rpm 离心 2min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

（选做步骤，宿主菌若是 DH5a 等不表达核酸酶的菌株，可以忽略此步骤。）

10.向吸附柱中加入 10ml 漂洗液 WB，8,000 rpm 离心 2min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

11.重复操作步骤 10。

12.向吸附柱中加入 3ml 无水乙醇，室温 8,000 rpm 离心 2min，倒掉废液。

13.将吸附柱重新放回收集管中，8,000rpm 离心 5min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

14.将吸附柱置于一个干净的 50 ml 收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 1-2ml 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2min，然后室温 8,000rpm 离心 2min。将离心下来的质粒 DNA 全部移入一个干净的 1.5ml 离心管，-20°C 保存。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 14。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH<sub>2</sub>O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.5-8.0 范围内，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 1ml，体积小影响回收效率。DNA 产物应保存在 -20°C，以防 DNA 降解。