

# 操作手册

## 去内毒素质粒小量提取试剂盒

Catalog No. TD429-50 (50 次反应)      TD429-100 (100 次反应)

TD429-400 (400 次反应)

### 产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	400 次
RNase A(冻干粉)	4℃	2 mg	2x2mg	2x8 ml
P1	4℃	15 ml	30 ml	100 ml
P2	室温	15 ml	30 ml	100 ml
P3	室温	15 ml	30 ml	120 ml
质粒 DNA 结合液	室温	15 ml	30 ml	110 ml
质粒 DNA 洗涤液 1	室温	40 ml	2x40 ml	320 ml
质粒 DNA 洗涤液 2	室温	12 ml	23 ml	3 x28 ml
			第一次使用前按说明加指定量乙醇	
质粒 DNA 洗脱液	室温	2 ml	10ml	30ml
2 号柱 P	室温	50 个	100 个	400 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	400 个

## 产品特点:

- 独有的显色反应，可以直接观察到细胞裂解中和的程度，极大方便操作者判断其状态。
- 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好，内毒素含量极低，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序转染等各种分子生物学实验。
- 此产品仅供科研使用。

## 注意事项:

1. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出沉淀，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。
2. 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。
3. 溶液 P3 和结合液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、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

## 特性:

- **DNA 纯度:** 获得的质粒产量高、纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序转染等各种分子生物学实验。一般情况  $Abs_{260/280} \geq 1.8$ ， $Abs_{260/230} \geq 2.0$ ，内毒素含量小于 1EU/ $\mu\text{g}$ 。
- **质粒 DNA 产量:** 每次可提取到最多约 50 $\mu\text{g}$ ，主要依据质粒的拷贝数，培养物的成长环境等因素。
- **质粒 DNA 大小:** 最高可达 200 kb。
- **洗脱体积:**  $\geq 25 \mu\text{l}$ 。
- **操作温度:** 室温 (15-30°C)。
- **操作时间:** 15 分钟

## 溶液制备: (使用之前需要配制)

1. 直接添加溶液 P1 到 RNase A 冻干粉中溶解, 然后将全部溶解的 RNase A 加回到 P1 中 (终浓度  $\geq 100\mu\text{g/ml}$ ), 添加了 RNase A 的 P1 最长可在 2-8°C 保存半年。

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. 试用装的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 已经添加乙醇无需添加。

50 次反应的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 应添加 46 ml 95% 的乙醇到 12ml 的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 中。

100 次反应的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 应添加 88 ml 95% 的乙醇到 23ml 的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 中

400 次反应的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 应添加 107 ml 95% 的乙醇到 28ml 的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 中。

*加入后请及时在方框打钩标记, 以免多次加入!*

## 操作步骤:

1. 取 0.5-5ml 过夜培养的菌液, 全速离心力下离心 15-20 秒, 尽可能多的去除上清, 收集菌体。
2. 用 250 $\mu\text{l}$  溶液 P1 重悬菌体沉淀, 可用吸头反复吹打或涡旋振荡至彻底悬浮。  
(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 250 $\mu\text{l}$  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 2-3 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, 如果菌体少, 很快清亮粘稠后就可以做下一步。)
4. 加 250 $\mu\text{l}$  溶液 P3 (预冷), 立即温和地上下翻转 3-4 次, 中和完全后会出现黄色絮状沉淀。(中和完全后溶液完全呈现为黄色)
5. 将上述中和的裂解物在冰上孵育 5 分钟。然后在 16,000 x g 的离心力下离心 5 分钟。
6. 将步骤 5 中的 600 $\mu\text{l}$  上清转移到干净的 1.5ml 离心管内。(不要碰到下面的黄色沉淀)
7. 然后在 1.5ml 离心管内加入 275 $\mu\text{l}$  质粒 DNA 结合液, 盖上盖子颠倒 8 次左右使其混匀。

以下步骤可以通过真空负压的方式也可以通过离心的方式进行操作 (负压设备所用真空多连器推荐美国 ZYMO RESEARCH 公司)

### 负压操作步骤:

1. 将 2 号柱 P 连接到负压真空多连器上，倒入第 7 步的混合液，打开真空开关使液体完全通过柱子。
2. 关掉真空开关，倒入 800 $\mu$ l 质粒洗涤液 1 到 2 号柱 P 内，打开真空开关，让液体完全通过柱子。
3. 关掉真空开关，加入 800 $\mu$ l 质粒 DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇!）到 2 号柱 P 内，打开真空开关让液体完全通过柱子。
4. 关掉真空开关，加入 200 $\mu$ l 质粒 DNA 洗涤液 2 到 2 号柱 P 内，打开真空开关，让液体完全通过柱子。
5. 将 2 号柱 P 套在 2ml 收集管上，然后放置在台式离心机上在 $\geq 10,000 \times g$  条件下空转 2 分钟以去除残留乙醇。
6. 将 2 号柱 P 套在一个干净的 1.5ml 离心管内，添加 25 $\mu$ l 的质粒 DNA 洗脱液到柱基质上。（洗脱液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10,000 \times g$  条件下离心 1 分钟来洗脱质粒 DNA。

### 离心操作步骤:

1. 将 2 号柱 P 套在 2ml 收集管上，倒入第 7 步的混合液，5000  $\times g$  离心力下离心 1 分钟，去除滤出液。
2. 加入 800 $\mu$ l 质粒洗涤液 1，5000  $\times g$  离心力下离心 1 分钟，弃废液。
3. 加入 800 $\mu$ l 质粒 DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇!），5000  $\times g$  离心力下离心 2 分钟，弃掉废液。
4. 加入 200 $\mu$ l 质粒 DNA 洗涤液 2，5000  $\times g$  离心力下离心 1 分钟，弃掉废液。
5. 在 $\geq 10,000 \times g$  条件下空转 2 分钟以去除残留乙醇。
6. 将 2 号柱 P 套在一个干净的 1.5ml 离心管内，添加 25 $\mu$ l 的质粒 DNA 洗脱液到柱基质上。（洗脱液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10,000 \times g$  条件下离心 1 分钟来洗脱质粒 DNA。