

操作手册

去内毒素质粒大量提取试剂盒

Catalog No. TD422-10 (10 次反应) TD422-20 (20 次反应)

产品组成:

试剂盒组成	保存	10 次	20 次
P1	4℃	150 ml	2 X 150 ml
P2	室温	150 ml	2 X 150 ml
P3 (黄色)	室温	150 ml	2 X 150 ml
质粒 DNA 结合液	室温	150 ml	2 X 150 ml
质粒 DNA 洗涤液 1	室温	55 ml	2 X 55 ml
质粒 DNA 洗涤液 2	室温	23 ml	2 X 23 ml
			第一次使用前按说明加指定量乙醇
质粒 DNA 洗脱液	室温	10ml	20ml
5 号柱 P 套装	室温	10 个	20 个
注射器套装	室温	10 个	20 个
收集管	室温	10 个	20 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 DNA 产量高、纯度好，且内毒素含量极低。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/ μg 。
- **质粒 DNA 产量:** 每次可提取到约 1.2 mg，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 200kb。
- **洗脱体积:** $\geq 200 \mu\text{l}$ 。
- **操作温度:** 室温 (15-30°C)。
- **操作时间:** 20 分钟

溶液制备: (使用之前需要配制)

1. RNase A 已经加入溶液 P1 (终浓度 100 μ g/ml) 置于 2-8 $^{\circ}$ 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。

试用装的 P1 已添加过 RNaseA

2. 2 次试用装的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 已经添加乙醇无需添加。

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。

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 150 ml 过夜培养的菌液, 在 $\geq 3,400 \times g$ 离心力下离心 10 分钟, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。
2. 用 14ml 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 14ml 的溶液 P2, 温和地上下翻转 4 -7 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 14ml 溶液 P3 (预冷), 立即温和地上下翻转 4 -7 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. 将一个 50ml 离心管放在离心管架子上准备收集过滤液, 然后把注射器下端的接头拧开并将上一步混合物慢慢倒入注射器内, 将注射器推杆推入注射器内慢慢推动收集过滤液 (大约会收集到 35ml 左右的过滤液)。
6. 然后在过滤液中加入 14ml 质粒 DNA 结合液, 盖上盖子颠倒 10 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. 确认 **5号柱 P (连接 15ml 和 50ml 套筒)** 连接紧密后放置在负压多连器上, 倒入第 6 步的混合液, 打开真空开关使液体完全通过柱子。
2. 去掉 50ml 套筒。
3. 关掉真空开关, 倒入 5ml 质粒洗涤液 1 到 15ml 套筒内, 打开真空开关, 让液体完全通过柱子。
4. 关掉真空开关, 加入 5ml 质粒 DNA 洗涤液 2 (请先检查是否已加入无水乙醇!) 到 15ml 套筒内, 打开真空开关让液体完全通过柱子。
5. 重复第 4 步。
6. 去掉 15ml 套筒, 将 5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。
7. 将 5号柱 P 套在一个干净的 1.5ml 离心管内, 添加 400 μ 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. 确认 **5号柱 P (连接 15ml 套筒)** 连接紧密后放置在一个 50ml 离心管里, 倒入 14ml 第 6 步的混合液, 500 $\times g$ 离心力下离心 2 分钟, 倒掉离心管中的混合液, 重复此步骤直到过滤液全部倒净。
2. 加入 5ml 质粒洗涤液 1, 500 $\times g$ 离心力下离心 2 分钟, 弃废液。
3. 加入 5ml 质粒 DNA 洗涤液 2 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 500 $\times g$ 离心力下离心 2 分钟, 弃掉废液。
4. 重复第 9 步。
5. 去掉 15ml 套筒, 将 5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 5号柱 P 套在一个干净的 1.5ml 离心管内, 添加 400 μ 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。