

# 操作手册

## 零内毒素质粒中量提取试剂盒

Catalog No. TD420 -25 (25 次反应)

### 产品组成:

试剂盒组成	保存	25 次
RNase A(冻干粉)	4℃	24 mg
P1	4℃	210 ml
P2	室温	210ml
P3 (黄色)	室温	210 ml
质粒 DNA 结合液	室温	210 ml
质粒 DNA 洗涤液 1	室温	55 ml
质粒 DNA 洗涤液 2	室温	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
3 号 P 柱套装	室温	25 个
注射器套装	室温	25 个
内毒素去除柱	室温	25 个
收集管	室温	25 个

Ver.1.8.2

## 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，且内毒素含量极低( $<0.025\text{EU}/\mu\text{g}$  质粒 DNA)，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染、体内细胞等各种敏感分子生物学实验。
- 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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $\text{Abs}_{260/280} \geq 1.8$  ，  $\text{Abs}_{260/230} \geq 2.0$  ，内毒素含量小于  $0.025\text{EU}/\mu\text{g}$ 。
- **质粒 DNA 产量:** 每次可提取到约  $300\mu\text{g}$  ，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 25 kb。
- **洗脱体积:**  $\geq 100 \mu\text{l}$ 。
- **操作温度:** 室温 ( $15\text{-}30^{\circ}\text{C}$ )。
- **操作时间:** 20 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** 请按照瓶体标注体积添加。

**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 50 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 8ml 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 8ml 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 8ml 溶液 P3, 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), 在  $\geq 3,400 \times g$  离心力下离心 5 分钟。
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 20ml 左右的过滤液)。
6. 然后在过滤液中加入 8ml 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 **3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 15ml 和 50ml 套筒，拧开 **3号柱 P** 上面的紫色盖子。
3. 关掉真空开关，倒入 2ml 质粒 DNA 洗涤液 1，打开真空开关，让液体完全通过 **3号柱 P**。
4. 关掉真空开关，加入 2ml 质粒 DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇!）到 **3号柱 P** 内，打开真空开关让液体完全通过柱子。
5. 重复第 4 步。
6. 将 **3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 **3号柱 P** 套在一个干净的 1.5ml 离心管内，添加 200 $\mu$ 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。
8. 将内毒素去除柱的盖子拧开并将去除柱套在一个干净的 1.5ml 离心管内。将上一步洗脱下来的质粒 DNA 全部加到去除柱内，室温下放置 2 分钟，在 5,000  $\times g$  的离心力下离心 1 分钟洗脱无内毒素的质粒 DNA。

### 离心操作步骤：

1. 确认 **3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 10ml 第 6 步的混合液，500  $\times g$  离心力下离心 2 分钟，倒掉离心管中的废液，重复此步骤直到混合液全部通过 **3号柱 P**。
2. 加入 2ml 质粒 DNA 洗涤液 1 到 **3号柱 P** 内，500  $\times g$  离心力下离心 2 分钟，弃废液。
3. 加入 2ml 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 3 步。
5. 去掉 15ml 套筒，拧开 **3号柱 P** 上面的紫色盖子，并将 **3号柱 P** 套入到收集管内。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 **3号柱 P** 套在一个干净的 1.5ml 离心管内，添加 200 $\mu$ 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。
8. 将内毒素去除柱的盖子拧开并将去除柱套在一个干净的 1.5ml 离心管内。将上一步洗脱下来的质粒 DNA 全部加到去除柱内，室温下放置 2 分钟，在 5,000  $\times g$  的离心力下离心 1 分钟洗脱无内毒素的质粒 DNA。