

# 操作手册

## 零内毒素质粒大量提取试剂盒

Catalog No. TD422 -10 (10 次反应)

### 产品组成:

试剂盒组成	保存	10 次	20 次
RNase A(冻干粉)	4℃	2x8mg	4x8mg ml
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 第一次使用前按说明加指定量乙醇	2 X 23 ml
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
内毒素去除柱	室温	10 个	20 个
收集管	室温	10 个	20 个

Ver 1.8.4

## 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( $<0.025\text{EU}/\mu\text{g}$  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 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 25 kb。
- **洗脱体积:**  $\geq 200 \mu\text{l}$ 。
- **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 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），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上清慢慢倒入注射器内，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，先添加 200 $\mu$ l 的质粒 DNA 洗脱液到柱基质上，待柱基质吸收后再直接添加 200 $\mu$ l 的质粒 DNA 洗脱液到柱基质上。(洗脱液总共添加 400 $\mu$ l，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 **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，先添加 200 $\mu$ l 的质粒 DNA 洗脱液到柱基质上，待柱基质吸收后再直接添加 200 $\mu$ l 的质粒 DNA 洗脱液到柱基质上。(洗脱液总共添加 400 $\mu$ l，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。
7. 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 x g 的离心力下离心 1 分钟洗脱无内毒素的质粒 DNA。