

操作手册

零内毒素质粒 DNA 小量提取试剂盒

Catalog No. TD436-50 (50 次反应) TD436-200 (200 次反应) TD436-400 (400 次反应)

产品组成:

| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 | 200 次 | 400 次 |
|--------------|-------|-----------------|---------|----------|
| RNase A | -20°C | 2 mg | 8 mg | 16 mg |
| P1 | 4°C | 15 ml | 60 ml | 100 ml |
| P2 | 室温 | 15 ml | 60 ml | 100 ml |
| P3 | 室温 | 15 ml | 60 ml | 120 ml |
| 质粒 DNA 结合液 | 室温 | 15 ml | 60 ml | 110 ml |
| 质粒 DNA 洗涤液 1 | 室温 | 2x20 ml | 2x80 ml | 320 ml |
| 质粒 DNA 洗涤液 2 | 室温 | 12 ml | 48 ml | 2 x48 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 | 200 个 | 400 个 |
| 内毒素去除柱 | 室温 | 50 个 | 200 个 | 400 个 |
| 收集管 (2ml) | 室温 | 50 个 | 200 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℃ 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/μg。
- **质粒 DNA 产量:** 每次可提取到约 100μg，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:** $\geq 25 \mu\text{l}$ 。
- **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. 第一次使用时, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 2-8℃ 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. 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 95-100% 的乙醇到 12ml 的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 中。
200 次反应的 **质粒 DNA 洗涤液 2** 应添加 184 ml 95-100% 的乙醇到 48ml 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 0.5-1.5ml 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 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。
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 $\times g$ 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. 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 μ 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 μ 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 μ 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 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。
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 $\times g$ 的离心力下离心 1 分钟洗脱无内毒素的质粒 DNA。