

# 质粒DNA快速少量提取试剂盒

(使用说明书 Ver.1.1.4)

## 产品亮点

- ◇ 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。

产品货号：

TD428-100 (100次反应)    TD428-200 (200次反应)    TD428-400 (400次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

# 目录Contents

产品组份	1
注意事项	1
产品特性	1
溶液制备	2
操作步骤	2
◇ 负压操作步骤	2
◇ 离心操作步骤	3
组件查询	3

## 产品组成

试剂盒组成	100次	200次	400次	保存
RNase A溶液	600 $\mu$ l	2*600 $\mu$ l	4*600 $\mu$ l	4°C
P1	30ml	60ml	2*60ml	4°C
P2	30ml	60ml	2*60ml	室温
P3	30ml	60ml	2*60ml	室温
质粒DNA洗涤液1	2*55ml	4*55ml	8*55ml	室温
质粒DNA洗涤液2	23ml	2*23ml	4*23ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇			
质粒DNA洗脱液	10ml	10ml	2*10ml	室温
2号PX纯化柱（带盖）	50个*2	50个*5	50个*8	室温
2ml收集管	50个*2	200个	200个*2	室温
2ml收集管（带盖）	50个*2	200个	200个*2	室温

## 注意事项

- ✧ 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。
- ✧ 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。
- ✧ 溶液P3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。
- ✧ 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数、细胞OD值等因素有关，细菌细胞OD值=5，得率最优。

## 产品特性

- ✧ 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Abs260/280 $\geq$ 1.8，Abs260/230 $\geq$ 2.0，内毒素含量小于1EU/ $\mu$ g。
- ✧ 质粒DNA产量：每次可提取到约100 $\mu$ g，主要依据质粒的拷贝数，培养物的成长环境、细胞OD值等因素。
- ✧ 质粒DNA大小：最高可达25kb。
- ✧ 洗脱体积： $\geq$ 25 $\mu$ l。
- ✧ 操作温度：室温（15-30°C）。
- ✧ 操作时间：15分钟。

## 溶液制备

- ✧ 第一次使用时，将试剂盒中全部RNase A加入溶液P1后（终浓度200 $\mu$ 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。
- ✧ 10次反应的质粒DNA洗涤液2，应添加20ml 95%的乙醇到5ml的质粒DNA洗涤液2中。100/200次反应的质粒DNA洗涤液2，应添加88ml 95%的乙醇到23ml的质粒DNA洗涤液2中加入后请及时在方框内打钩标记，以免多次加入！
- ✧ P3在使用前需要在冰上预先冷却。
- ✧ 准备预冷过的异丙醇备用。

## 操作步骤:

1. 取1-3ml过夜培养的菌液（OD值=5得率最优，需满足此条件，过多菌量会导致裂解不完全，或者堵纯化柱的状况）转移到带盖收集管中全速离心力下离心30秒尽可能多的去除上清收集菌体。
2. 用300 $\mu$ 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300 $\mu$ l溶液P2，温和地上下翻转8次使菌体充分裂解，室温放置2-5分钟。（温和地混合，不要剧烈振荡，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300 $\mu$ l溶液P3（预冷），立即温和地上下翻转8次，中和完全后会出现黄色絮状沉淀。（中和完全后溶液呈现黄色，且没有形成结团的现象，中和物相对松散）
5. 将上述中和的裂解物在 16,000 xg 的离心力下离心 5 分钟。
6. 将步骤5中的大约最多750 $\mu$ 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. 在1.5ml离心管内加入0.6倍~0.8倍预冷的异丙醇（过多的异丙醇可能导致RNA残留量增加），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PX纯化柱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纯化柱。
2. 关掉真空开关，倒入800 $\mu$ l质粒洗涤液1到2号PX纯化柱内，打开真空开关，让液体完全通过纯化柱。
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PX纯化柱内，打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
4. 将2号PX纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000$ xg条件下空转2分钟以去除残留乙醇。

- 将2号PX纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加25μl-50μl的质粒DNA洗脱液到纯化柱基质上。（洗脱液事先在65-70°C水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在 $\geq 10,000xg$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

#### 离心操作步骤

- 将2号PX纯化柱套在2ml收集管上，倒入第7步的混合液，10000xg离心力下离心1分钟，去除滤出液。
- 加入800μl质粒DNA洗涤液1，10000xg离心力下离心1分钟，弃掉废液。
- 加入800μl质粒DNA洗涤液2（先检查是否已添加无水乙醇）10000xg离心力下离心1分钟，弃掉废液。
- 将2号PX纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000xg$ 条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
- 将2号PX纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加25μl-50μl的质粒DNA洗脱液到纯化柱基质上。（洗脱液事先在65-70°C水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在 $\geq 10,000xg$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

## 组件查询

组件名称	货号	规格	保存
RNase A溶液	TE1008-0.6	600μl	4°C
P1	TD4200-1-30	30ml	4°C
	TD4200-1-60	60ml	
P2	TD4200-2-30	30ml	室温
	TD4200-2-60	60ml	
P3	TD4200-3-30	30ml	室温
	TD4200-3-60	60ml	
质粒DNA洗涤液1	TD4200-9-55	55ml	室温
质粒DNA洗涤液2	TD4200-10-23	23ml	室温
质粒DNA洗脱液	TD4200-7-10	10ml	室温
2号PX纯化柱（带盖）	TC1086-50-C	50个	室温
2ml收集管	TC1001-50	50个	室温
	TC1001-200	200个	
2ml收集管（带盖）	TC1001-50-C	50个	室温
	TC1001-200-C	200个	