

# 零内毒素质粒快速中量提取试剂盒

(使用说明书 Ver.0.0.6)

## 产品说明

- ✧ 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 ( $\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$ )，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。

产品货号：

TD419- 25 (25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     | 2 |
| 溶液制备     | 2 |
| 操作步骤     | 2 |
| ✧ 负压操作步骤 | 3 |
| ✧ 离心操作步骤 | 3 |
| 组件查询     | 4 |

## 产品组份

| 试剂盒组成                   | 25次                     | 保存  |
|-------------------------|-------------------------|-----|
| RNase A溶液               | 2*1ml+0.6ml             | 4°C |
| P1                      | 210ml                   | 4°C |
| P2                      | 210ml                   | 室温  |
| P3                      | 210ml                   | 室温  |
| 质粒DNA洗涤液1               | 55ml                    | 室温  |
| 质粒DNA洗涤液2               | 23ml<br>第一次使用前按说明加指定量乙醇 | 室温  |
| 质粒DNA洗脱液                | 10ml                    | 室温  |
| 5号PS纯化柱+15ml漏斗 X+50ml漏斗 | 5个*5                    | 室温  |
| 注射器内芯                   | 5个*5                    | 室温  |
| 注射器外套(含滤网)              | 5个*5                    | 室温  |
| 2号内毒素去除柱                | 25个                     | 室温  |
| 2ml收集管                  | 25个                     | 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OD值、质粒拷贝数等因素有关，过多的菌液并不能带来更高的质粒产量，反而有可能影响裂解能力，使浓度和纯度都有所降低，菌液的细胞数量严格按照OD值的标准操作，并且符合菌液上样量。
- ❖ 菌液OD值在 $\leq 5$ 时，进行质粒DNA提取内毒素可低至 ( $\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$ )
- ❖ 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。

## 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 $\leq 0.1EU/\mu g$ 。
- ✧ 质粒DNA产量：每次可提取到约  $100\mu g \sim 300\mu g$ ，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25kb。（片段长度不同与菌种相关）。
- ✧ 洗脱体积： $\geq 200\mu l$ 。
- ✧ 操作温度：室温（15-30°C）。
- ✧ 操作时间： $\leq 25$ 分钟

## 溶液制备

- ✧ 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 $\sim 200\mu g/ml$ ）置于4°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。  
注：试用装的P1已添加过RNaseA
- ✧ 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 无水乙醇到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！

## 操作步骤:

1. 取50ml过夜培养的菌液，OD值 $\leq 5$ ，在 $\geq 5000 \times g$ 离心力下离心5分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
2. 用8ml的溶液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8次使菌体充分裂解，室温放置 $\leq 5$ 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预冷过的溶液P3，温和地上下翻转8次或者更多次，直到中和完全后，会出现白色絮状沉淀。（中和物应蓬松均匀，无黏性团状等状态，中和完全后溶液完全呈现为黄色），在 $\geq 5000 \times g$ 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0.6倍~0.8倍预冷过的异丙醇，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PS纯化柱（连接15ml和50ml漏斗）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纯化柱。
2. 去掉50ml漏斗。
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5号PS纯化柱。
4. 关掉真空开关，加入3ml质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入无水乙醇），打开真空开关，让液体完全通过5号PS纯化柱。
5. 将5号PS纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
6. 将5号PS纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加200-400 $\mu$ l的质粒DNA洗脱液到纯化柱上。（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 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

推荐：将洗脱后的质粒DNA重新加回到纯化柱上，进行二次洗脱可以提高产量。如需要浓度较高的质粒DNA推荐添加200 $\mu$ l的质粒DNA洗脱液。

以下为可选步骤（注：内毒素去除柱的有效使用，可能会造成浓度下降，得率损失属于正常情况）

7. 将内毒素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8,000xg的离心力下离心5分钟洗脱无内毒素的质粒DNA。

#### 离心操作步骤：

1. 确认5号PS纯化柱（连接15ml漏斗）连接紧密后放置在一个50ml离心管里，倒入第6步的混合液，1000xg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5号PS纯化柱。
2. 加入2ml质粒DNA洗涤液1到5号PS纯化柱内，1000 x g离心力下离心2分钟，弃掉废液。
3. 加入3ml质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入无水乙醇！），1000 x g离心力下离心2分钟，弃掉废液。
4. 去掉15ml漏斗，并将5号PS纯化柱套入到收集管内。然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
5. 将5号PS纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加200-400 $\mu$ l的质粒DNA洗脱液到纯化柱上。（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 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

以下为可选步骤（注：内毒素去除柱的有效使用，可能会造成浓度下降，得率损失属于正常情况）

6. 将内毒素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。

## 组件查询

| 组件名称                       | 货号           | 规格    | 储存条件 |
|----------------------------|--------------|-------|------|
| RNase A溶液                  | TE1008-1     | 1ml   | 4°C  |
|                            | TE1008-0.6   | 0.6ml | 4°C  |
|                            | TE1008-0.3   | 0.3ml | 4°C  |
| P1                         | TD4200-1-150 | 150ml | 4°C  |
|                            | TD4200-1-210 | 210ml | 4°C  |
|                            | TD4200-1-410 | 410ml | 4°C  |
| P2                         | TD4200-2-150 | 150ml | 室温   |
|                            | TD4200-2-210 | 210ml | 室温   |
|                            | TD4200-2-410 | 410ml | 室温   |
| P3                         | TD4200-3-150 | 150ml | 室温   |
|                            | TD4200-3-210 | 210ml | 室温   |
|                            | TD4200-3-410 | 410ml | 室温   |
| 质粒DNA洗涤液1                  | TD4200-9-55  | 55ml  | 室温   |
| 质粒DNA洗涤液2 (未加乙醇)           | TD4200-10-23 | 23ml  | 室温   |
| 质粒DNA洗脱液                   | TD4200-7-10  | 10ml  | 室温   |
|                            | TD4200-7-20  | 20ml  | 室温   |
|                            | TD4200-7-30  | 30ml  | 室温   |
| 5号PS纯化柱+15ml漏斗X+<br>50ml漏斗 | TC1083-5     | 5个    | 室温   |
| 注射器内芯                      | TC1037-5     | 5个    | 室温   |
| 注射器外套(含滤网)                 | TC1092-5     | 5个    | 室温   |
| 2号内毒素去除柱                   | TC1060-25    | 25个   | 室温   |
| 2ml 收集管                    | TC1001-25    | 25个   | 室温   |