

零内毒素质粒小量中提取试剂盒

(使用说明书 Ver.1.3.8)

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，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:

TD436- 5 (5次反应) TD436- 50 (50次反应)

TD436- 100 (100次反应) TD436- 200 (200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	2
◇ 离心操作步骤	3
组件查询	3

产品组份

试剂盒组成	5次	50次	100次	200次	保存
RNase A溶液	100 μ l	600 μ l	2*600 μ l	4*600 μ l	4 $^{\circ}$ C
P1	10 ml	60 ml	2 x60 ml	4 x60 ml	4 $^{\circ}$ C
P2	10 ml	60 ml	2 x60 ml	4 x60 ml	室温
P3	10 ml	60 ml	2 x60 ml	4 x60 ml	室温
质粒DNA结合液	10 ml	60 ml	2 x60 ml	4 x60 ml	室温
质粒DNA洗涤液1	20 ml	55 ml	2 x55 ml	4 x55 ml	室温
质粒DNA洗涤液2	5 ml	23 ml	2 x23 ml	4 x23 ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇				
质粒DNA洗脱液	1 ml	5ml	10 ml	15 ml	室温
3号 PN 纯化柱	5个	50个	2 x 50个	4 x 50个	室温
2号内毒素去除柱	5个	50个	2 x 50个	4 x 50个	室温
2ml收集管	5个	50个	2 x 50个	200个	室温
2ml收集管 (带盖)	5个	50个	2 x 50个	200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 $^{\circ}$ 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。
- ◇ 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
- ◇ 过高的菌液量参与提取，会导致P2碱性裂解液裂解不充分，影响质粒DNA的纯度与浓度。
- ◇ 合适的细菌细胞量关乎整个提取流程的稳定性，建议监测菌液OD值，值在3~5的之间，内毒素含量可低至(≤ 0.1 EU/ μ g)。

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/ μ g。
- ◇ 质粒DNA产量：每次可提取到约100 μ 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200 kb。（片段长度不同与菌种相关）
- ◇ 洗脱体积： \geq 50 μ l。
- ◇ 操作温度：室温 (15-30°C)。
- ◇ 操作时间：18分钟。

溶液制备（使用之前需配制）

- ◇ 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°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。试用装的P1已添加过RNaseA。
- ◇ 5次反应的质粒DNA洗涤液2，应添加19 ml 95%的乙醇到5ml的质粒DNA洗涤液2中。50/100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！
- ◇ P1置于4°冰箱中保存。

操作步骤：

1. 取5-10ml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1ml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1ml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，不要剧烈振荡，以免质粒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1ml溶液P3（预冷），立即温和地上下翻转3-4次，中和完全后会呈现稀松黄色絮状沉淀。
(中和完全后溶液呈现黄色透明液相，中和物不应有黏性抱团现象。)
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~3ml上清转移到干净的15ml离心管内。（不要碰到下面的黄色沉淀）
7. 在上述离心管内加入1ml质粒DNA结合液，盖上盖子颠倒8次左右使其混匀（如果出现浑浊现象，会造成堵纯化柱情况，需要补少量质粒结合液，浑浊现象消失）。

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3号PN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 μ l质粒洗涤液1到3号PN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 μ l质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入无水乙醇!）到3号PN纯化柱内，打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
4. 关掉真空开关，加入800 μ l质粒DNA洗涤液2到3号PN纯化柱内，打开真空开关，让液体完全通过纯化柱。
5. 将3号PN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3号PN纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加50 μ l的质粒DNA洗脱液到纯化柱基质上。（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全部加到内毒素去除柱内，室温放置2分钟，在5000 $\times g$ 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3号PN纯化柱套在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，弃掉废液。
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800 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3号PN纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添50 μ l的质粒DNA洗脱液到纯化柱基质上。（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全部加到内毒素去除柱内，室温放置2分钟，在5000 $\times g$ 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 $^{\circ}$ C
	TE1008-0.6	0.6ml	4 $^{\circ}$ C
P1	TD4200-1-10	10ml	4 $^{\circ}$ C
	TD4200-1-60	60ml	4 $^{\circ}$ C

	TD4200-1-150	150ml	4°C
P2	TD4200-2-10	10ml	室温
	TD4200-2-60	60ml	室温
	TD4200-2-150	150ml	室温
P3	TD4200-3-10	10ml	室温
	TD4200-3-60	60ml	室温
	TD4200-3-150	150ml	室温
质粒DNA结合液	TD4200-4-10	10ml	室温
	TD4200-4-60	60ml	室温
质粒DNA洗涤液1	TD4200-5-20	20ml	室温
	TD4200-5-55	55ml	室温
质粒DNA洗涤液2 (未加乙醇)	TD4200-6-5	5ml	室温
	TD4200-6-23	23ml	室温
质粒DNA洗脱液	TD4200-7-1	1ml	室温
	TD4200-7-5	5ml	室温
	TD4200-7-10	10ml	室温
	TD4200-7-15	15ml	室温
3号PN纯化柱	TC1040-PN-5	5个	室温
	TC1040-PN-50	50个	室温
2号内毒素去除柱	TC1060-5	5个	室温
	TC1060-50	50个	室温
2ml收集管	TC1001-5	5个	室温
	TC1001-50	50个	室温
	TC1001-200	200个	室温
2ml收集管 (带盖)	TC1001-5-C	5个	室温
	TC1001-50-C	50个	室温
	TC1001-200-C	200个	室温