

零内毒素质粒大量提取试剂盒

(使用说明书 Ver.1.1.3)

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：

TD421-plus-10 (10次反应) TD421-plus-20 (20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	10次	20次	保存
RNase A溶液	1ml+0.6ml	2*1ml+0.6ml	4°C
P1	150 ml	2*150 ml	4°C
P2	150ml	2*150ml	室温
P3	150 ml	2*150 ml	室温
内毒素去除液	50ml	100ml	室温
质粒DNA洗涤液1	2*55 ml	4*55 ml	室温
质粒DNA洗涤液2	23 ml	2*23 ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇		
质粒DNA洗脱液	10ml	20ml	室温
5号PX纯化柱+15ml漏斗X+50ml漏斗	5个*2	5个*4	室温
注射器内芯	5个*2	5个*4	室温
注射器外套（含滤网）	5个*2	5个*4	室温
3号内毒素去除柱	10个	10个*2	室温
2ml收集管	20个	20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 ≤ 5 之间，内毒素含量可低至 ($\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$)。

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 $\text{Abs}260/280 \geq 1.8$ ， $\text{Abs}260/230 \geq 2.0$ ，内毒素含量 $\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$ 。
- ◇ 质粒DNA产量：每次可提取到约 $800\mu\text{g}$ ，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： $\geq 600\mu\text{l}$ 。
- ◇ 操作温度：室温 ($15\text{-}30^\circ\text{C}$)。
- ◇ 操作时间：20分钟

溶液制备

- ◇ 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 $\sim 100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）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请按照瓶体标注乙醇体积添加。
质粒DNA洗涤液2 应添加 83 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！
- ◇ 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 150 ml 过夜培养的菌液，在 $\geq 3,400 \times \text{g}$ 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 $4\text{-}7$ 次使菌体充分裂解，室温放置 $2\text{-}3$ 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 14ml 溶液P3（预冷），立即温和地上下翻转 $4\text{-}7$ 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)，在 $\geq 3,400 \times \text{g}$ 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. 取 4ml 内毒素去除液，加入上述体系当中，充分混匀，静置 5min 。
7. 在上述混合液中加入 0.6 倍预冷过的异丙醇，盖上盖子颠倒数次使其充分混匀。

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PX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7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10ml质粒洗涤液1到15ml漏斗内，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10ml质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入无水乙醇！）到15ml漏斗内，打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
5. 去掉15ml漏斗，将5号PX纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
6. 将5号PX纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加600-800 μ l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 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

推荐：将洗脱后的DNA加回到纯化柱基质上，进行二次洗脱可以提高产量。

以下为可选步骤（注：如要获得内毒素含量更低的质粒DNA,则需要使用内毒素去除柱。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收集管内。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。将得到的质粒转移到1.5ml离心管保存或使用。

离心操作步骤：

1. 确认5号PX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7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10ml质粒洗涤液1， $500 \times g$ 离心力下离心2分钟，弃掉废液。
3. 加入10ml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. 去掉15ml漏斗，将5号PX纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下空转2分钟，以去除残留乙醇。
5. 将5号PX纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加600-800 μ l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 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

推荐：将洗脱后的DNA加回到纯化柱基质上，进行二次洗脱可以提高产量。

以下为可选步骤（注：如要获得内毒素含量更低的质粒DNA,则需要使用内毒素去除柱。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收集管内。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。得到的质粒转移到1.5ml离心管保存或使用。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
RNase A溶液	TE1008-1	1ml	4℃
	TE1008-0.6	0.6ml	4℃
	TE1008-0.3	0.3ml	4℃
P1	TD4200-1-150	150ml	4℃
	TD4200-1-210	210ml	4℃
	TD4200-1-410	410ml	4℃
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
内毒素去除液	TD4200-8-50	50ml	室温
	TD4200-8-100	100ml	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PX纯化柱+15ml漏斗X+ 50ml漏斗	TC1082-5	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
3号内毒素去除柱	TC1051-10	10个	室温
2ml收集管	TC1001-20	20个	室温