

零内毒素质粒快速大量提取试剂盒

使用说明书 (Ver.0.0.3)

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 ($\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$)，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：

TD421-2 (2 次反应) TD421-10 (10 次反应) TD421-20 (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
FAQ 常见问题及解决方法	4
组件查询	6

产品组份

试剂盒组成	2 次	10 次	20 次	保存
RNaseA 溶液	300 μ l	1ml+0.6ml	2* (1ml+0.6ml)	4°C
P1	30ml	150ml	2*150ml	4°C
P2	30ml	150ml	2*150ml	室温
P3	30ml	150ml	2*150ml	室温
质粒 DNA 洗涤液 1	22ml	2*55ml	4*55ml	室温
质粒 DNA 洗涤液 2	6ml	23ml	2*23ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇			
质粒 DNA 洗脱液	2ml	10ml	20ml	室温
5 号 PX 纯化柱+15ml 漏斗 X+50ml 漏斗	2 个	10 个	20 个	室温
注射器内芯	2 个	10 个	20 个	室温
注射器外套	2 个	10 个	20 个	室温
3 号内毒素去除柱	2 个	10 个	20 个	室温
2ml 收集管	2 个	20 个	40 个	室温

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°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。
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 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。
5. 菌液 OD 值在 ≤ 5 时，进行质粒 DNA 提取内毒素可低至 ($\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$)

6. 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、纯度高，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 $\leq 0.1EU/\mu g$ 。
- ◇ 质粒 DNA 产量：每次可提取到约 800 μg ，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 200kb。（片段长度不同与菌种相关）
- ◇ 洗脱体积： $\geq 600\mu l$ 。
- ◇ 操作温度：室温（15-30 $^{\circ}C$ ）。
- ◇ 操作时间： ≤ 25 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 RNaseA 加入溶液 P1 后（终浓度 $\sim 200\mu g/ml$ ）置于 4 $^{\circ}C$ 保存。如果溶液 P1 中 RNaseA 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNaseA 即可。
2. 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 88ml 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 150ml 过夜培养的菌液，OD 值 ≤ 5 ，在 $\geq 5000g$ 离心力下离心 5 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 8 次使菌体充分裂解，室温放置 ≤ 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 14ml 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，中和完全后溶液呈现黄色），在 $\geq 5000g$ 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. 在上述混合液中加入 0.6~0.8 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 ZYMORESEARCH 公司）

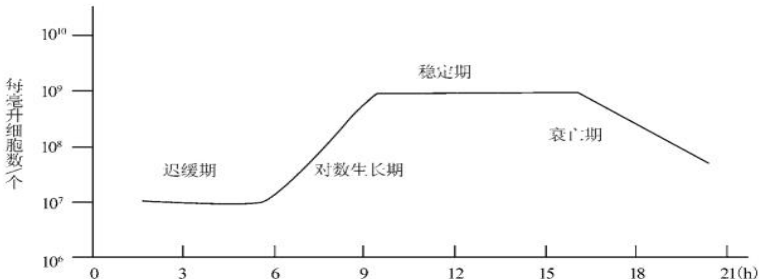
负压操作步骤：

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 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 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 $\geq 10000xg$ 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 $^{\circ}$ C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10000xg$ 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。
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 5000xg 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：

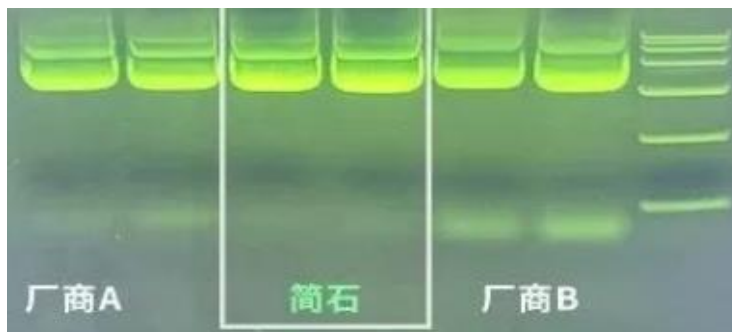
1. 确认 5 号 PX 纯化柱（连接 15ml 漏斗）连接紧密后放置在一个 50ml 离心管里，倒入第 6 步的混合液，1000xg 离心力下离心 2 分钟，倒掉离心管中的混合液，重复此步骤直到过滤液全部倒净。
2. 加入 10ml 质粒 DNA 洗涤液 1，1000xg 离心力下离心 2 分钟，弃废液。
3. 加入 10ml 质粒 DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇！），1000xg 离心力下离心 2 分钟，弃掉废液。
4. 去掉 15ml 漏斗，将 5 号 PX 纯化柱套在 2ml 收集管上，然后放置在台式离心机在 $\geq 10000xg$ 条件下空转 2 分钟以去除残留乙醇。
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 $^{\circ}$ C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10000xg$ 条件下离心 1 分钟来洗脱质粒 DNA。
6. 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。
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 5000xg 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。

FAQ常见问题及解决方法

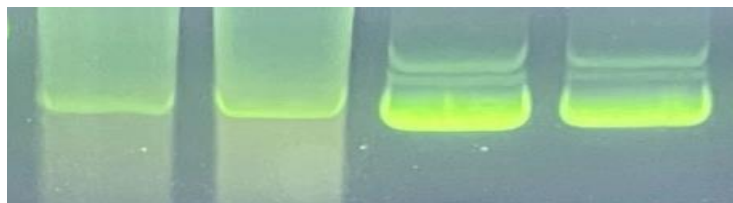
Q: 问题	A: 可能的原因和建议的解决方案
<p>标准的菌液培养, 避免杂菌污染</p>	<p>a) 无菌化的操作环境, 具备基本的二级生物安全防护意识, 培养使用设备常规消杀 (2mg/ml 次氯酸或者 75%无水乙醇 V/V), 使用的相关耗材, 采用正确的灭菌方式, 如下:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✧ 普通型下排气式压力蒸气灭菌器, 压力升至 103.4kPa (1.05kg/cm²) 温度达 121.3°C, 维持 15~30 分钟, 可达到灭菌目的。 ✧ 严谨型脉冲真空压力蒸气灭菌器, 蒸气压力 205.8kPa (2.1kg/cm²), 温度达 132°C 以上并维持 20 分钟, 即可杀死包括具有顽强抵抗力的芽孢、孢子、一切微生物。 <p>b) 挑取单菌落小量培养后转大体积培养, 注意溶氧量的问题, 培养总体积不要过大, 一般为培养瓶的 20% 体积, 使用透气性好的封瓶膜, 转数 200rpm~250rpm。</p> <p>c) 注意杂菌生长问题, 菌落是否正常生长, 正确的选用抗生素不可忽略, 培养基的 PH=7.2, 培养时间 8~16H 温控在 37°C。</p> 
<p>质粒得率低或没有</p>	<p>a) 部分质粒本身不稳定, 不能频繁转接, 或造成质粒丢失, 每次接种应接种单菌落, 另外选用的抗生素的浓度是否正确。</p> <p>b) 质粒抽提试剂使用不当: P2 在温度较低的情况下会出现浑浊, 降低对细胞膜的裂解效率, 使得质粒产量低, 立即将试剂置于 37°C 左右的水浴当中复溶后使用, 正确的细胞数量裂解后应呈现粘稠透亮的液相。仍现部分浑浊现象为少量大肠杆菌细胞未能裂解。</p> <p>c) OD 值对质粒提取的至关重要性: 最佳性能提取及最佳吸光值, 细胞数量保持 OD 值=5, 可选择自然过夜培养的菌液, 稀释约十倍左右, 或自行稀释最佳性能的 OD 值。(OD 值是细胞数量, 与说明书当中的标注上样量两者皆满足条件, 才能得到最好的实验结果)</p> <p>d) P3 中和过程的重要性: 中和状态, 应该是稀松, 有质地较轻漂浮到液面顶端, 大肠杆菌中的蛋白质、破裂的细胞膜和变性的染色体会相互缠绕成大型复合物, 离子交换过程, 复合物会从溶液中有效地沉淀下来, 有效去除基因组 DNA, 并提高得率, 离心除去沉淀后, 就可以从上清中回收复性的质粒 DNA。过多菌量并不一定能带来更多的质粒 DNA, 反而会造成提取过程当中不必要的麻烦, 例如堵柱子, 导致得率较低。</p>

- a) 过多的细胞数量会导致 RNA 残留过多，使得 RNaseA 的酶达到极值，不能消化掉更多的 RNA。RNA 残留过多影响核酸浓度值，使浓度纯度数据不准确。解决办法为降低菌液量，严格按照标注的 OD 值进行操作，或调高 RNaseA 的浓度（杂菌过多 RNA 含量高）。
- b) 不同的菌种内含 RNA\内毒素基础含量不同，需尝试不同条件提取质粒，例如调高 RNaseA 的浓度，出厂设置的 RNaseA 浓度 100 μ g/ml，内毒素含量过多可尝试重复使用内毒素去除柱，（注：RNA 残留过多质粒总浓度会虚高，RNA 的有效去除、内毒素去除柱的多次有效使用，会降低质粒总浓度，属正常现象）
- c) 质粒 DNA 质量标准
- ✧ 电泳点样孔异常亮：质粒中污染了细菌基因组 DNA 多是由于 P2 加入后振荡过于剧烈，导致基因组 DNA 剪切或放置时间过长导致的。
 - ✧ 质粒 DNA 条带下方 500bp 左右有条带或者荧光团的存在，RNA 残留，需调整参与提取的菌液用量，或者调整 RNaseA 的浓度；

RNA 残留多，
内毒素超标。



- ✧ 电泳条带不完整，弥散。



前两孔为杂菌 DNA 污染，裂解不充分，洗涤液性能衰退。后两孔为正常质粒提取，浓度及纯度达到性能标准，条带完整，无基因组 DNA 和 RNA 污染，无降解。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
RNaseA 溶液	TE1008-1	1ml	4°C
	TE1008-0.6	600μl	
	TE1008-0.3	300μl	
P1	TD4200-1-30	30ml	4°C
	TD4200-1-150	150ml	
P2	TD4200-2-30	30ml	室温
	TD4200-2-150	150ml	
P3	TD4200-3-30	30ml	室温
	TD4200-3-150	150ml	
质粒 DNA 洗涤液 1	TD4200-9-22	22ml	室温
	TD4200-9-55	55ml	
质粒 DNA 洗涤液 2 (未加乙醇)	TD4200-10-6	6ml	室温
	TD4200-10-23	23ml	
质粒 DNA 洗脱液	TD4200-7-2	2ml	室温
	TD4200-7-10	10ml	
	TD4200-7-20	20ml	
5号PX纯化柱+15ml漏斗X+50ml漏斗	TC1082-5	5个	室温
	TC1082-2	2个	
注射器内芯	TC1037-2	2个	室温
	TC1037-5	5个	
注射器外套	TC1092-2	2个	室温
	TC1092-5	5个	
3号内毒素去除柱	TC1051-2	2个	室温
	TC1051-10	10个	
2ml收集管	TC1001-2	2个	室温
	TC1001-20	20个	