

# 质粒DNA超快速小提中量试剂盒

(使用说明书 Ver.1.2.0)

## 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：

TD435 -5 (5次反应)    TD435 -50 (50次反应)    TD435 -100 (100次反应)

TD435 -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	3
◇ 离心操作步骤	3
组件查询	4

## 产品组份

试剂盒组成	5次	50次	100次	200次	保存
RNase A溶液	100 $\mu$ l	600 $\mu$ l	2*600 $\mu$ l	4*600 $\mu$ l	4°C
P1	10 ml	60 ml	2 x60 ml	4 x60 ml	4°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（带盖）	5个	50个	2*50个	4*50个	室温
2ml收集管	5个	50个	2*50个	200个	室温
5ml离心管	5个	50个	2*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°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Abs260/280  $\geq 1.8$ ，Abs260/230  $\geq 2.0$ ，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100 $\mu\text{g}$ ，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50 kb。（片段长度不同与菌种相关）
- ✧ 洗脱体积： $\geq 50\ \mu\text{l}$ 。
- ✧ 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100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）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20ml 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88 ml 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°C冰箱中保存。

## 操作步骤:

1. 取5ml~20ml过夜培养的菌液，全速离心15~20秒，尽可能的去除上清，收集菌体。(如遇高拷贝菌种，可按比例增加试剂的用量，菌量过多会降低裂解能力，伴随纯度下降。)
2. 用500 $\mu\text{l}$ 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500 $\mu\text{l}$ 的溶液P2，温和地上下翻转数次使菌体充分裂解，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850 $\mu\text{l}$ 溶液P3（预冷），立即温和地上下翻转数次，中和完全后会出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  $\times$  g的离心力下离心5分钟。
6. 将步骤5中的~1500 $\mu\text{l}$ 上清转移到干净的5ml离心管内。（不要碰到下面的黄色沉淀）

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 $\mu$ l质粒洗涤液1到3号PN纯化柱，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3号PN纯化柱内，打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
4. 重复步骤3
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100 $\mu$ 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。

#### 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，10000  $\times g$ 离心力下离心1分钟，去除滤出液。
2. 加入800 $\mu$ l质粒洗涤液1，10000  $\times g$ 离心力下离心1分钟，弃掉废液。
3. 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！），10000  $\times g$ 离心力下离心1分钟，弃掉废液。
4. 重复步骤3
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100 $\mu$ 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。

## 组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
RNaseA溶液	TE1008-0.1	100μl	4°C
	TE1008-0.6	600μl	
P1	TD4200-1-10	10ml	4°C
	TD4200-1-60	60ml	
P2	TD4200-2-10	10ml	室温
	TD4200-2-60	60ml	
P3	TD4200-3-N-10	10ml	室温
	TD4200-3-N-60	60ml	
质粒DNA洗涤液1	TD4200-9-20	20ml	室温
	TD4200-9-55	55ml	
质粒DNA洗涤液2（未添加乙醇）	TD4200-10-5	5ml	室温
	TD4200-10-23	23ml	
质粒DNA洗脱液	TD4200-7-1	1ml	室温
	TD4200-7-5	5ml	
	TD4200-7-10	10ml	
	TD4200-7-15	15ml	
3号PN 纯化柱（带盖）	TC1040-PN-5	5个	室温
	TC1040-PN-50	50个	
2ml收集管	TC1001-5	5个	室温
	TC1001-50	50个	
	TC1001-200	200个	
5ml离心管		5个	室温
		50个	
		200个	