

# 去内毒素质粒小提中量试剂盒-PLUS

(使用说明书 Ver.1.4.1)

## 产品说明

- ◇ 独有的显色反应，可以直接观察到细胞裂解或中和程度，极大方便操作者判断实验状态。
- ◇ 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。
- ◇ 此产品仅供科研使用。

产品货号:

TD436-plus-5 (5次反应) TD436-plus-50 (50次反应)

TD436-plus-100 (100次反应) TD436-plus-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	100µl	600µl	2*600µl	4*600µl	4℃
P1 (红)	10 ml	60 ml	2 x60 ml	4 x60 ml	4℃
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
内毒素去除液	2 ml	15ml	30 ml	2 x30 ml	室温
PBD 平衡液	20 ml	55 ml	2 x55 ml	4 x55 ml	室温
质粒DNA洗涤液	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

## 注意事项

- ✧ 全程操作应尽量在超净台中，所用耗材或移液器，应定期进行高温高压灭菌或紫外消杀或次氯酸洁净擦拭，保证内毒素处理环境标准化。
- ✧ 无DNase / RNase 水，双蒸水或蒸馏剂检测专用水，一定避免敞口放置，操作过程当中及时更换移液器吸头，避免外源性内毒素带入，影响最终实验结果准确性。
- ✧ 环境温度低时，溶液P2中SDS可能会析出沉淀，可在37℃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。
- ✧ 内毒素去除液避免敞口放置，避免高温、强光，实验室常温≤25° 避光储藏。
- ✧ 溶液P3中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，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的 OD值、拷贝数等因素相关，过多的菌液并不能带来更高的产量，反而影响裂解能力，浓度和纯度受影响；过多的菌量还可能造成RNA污染，细菌内毒素超标；

菌液的细胞数量严格按照OD值的标准操作，并且符合下述菌液上样量（标准情况为：例如OD值=3~5，菌液用量在15ml封顶）。

## 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。
- ◇ 内毒素含量区间：0.025~1EU $\mu$ g（过多的菌液投入量伴随更高的内毒素基础含量，使得处理后，达不到所标识的内毒素级别；请严格按照实际的菌液细胞数量及下述菌液体积操作）。
- ◇ 质粒DNA产量：每次可提取到约 $\geq$ 100 $\mu$ g，主要依据质粒的拷贝数，细胞数量，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： $\geq$ 50 $\mu$ l。
- ◇ 操作温度：室温（15-22 $^{\circ}$ C）。
- ◇ 操作时间：20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 $^{\circ}$ 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，应添加20ml的乙醇到5ml的质粒DNA洗涤液中。  
50/100次反应的质粒DNA洗涤液，应添加88 ml的乙醇到23ml的质粒DNA洗涤液中，加入后请及时在方框内打钩标记，以免多次加入！
- ◇ P1置于4 $^{\circ}$ 冰箱中保存。
- ◇ 内毒素去除液 \ PBD 平衡液避免高温，强光储藏。

## 操作步骤：

1. 取5ml~15ml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。（如遇低拷贝菌种，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 $\mu$ l溶液P1（红）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 $\mu$ 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2-5分钟。（温和的混合，不要剧烈振荡，以免质粒DNA破坏！所用时间不应超过5分钟！以免质粒破坏。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500 $\mu$ l溶液P3, 立即温和地上下翻转数次, 中和完全后红色液相完全消失, 伴随出现稀松黄色絮状沉淀。 $\geq 16000g$  离心5min, 所有白色沉淀固定于管底部。
5. 用移液器将步骤4中的约~1200 $\mu$ l 上清小心的转移到干净的15ml离心管内。(不要碰到下面的黄色沉淀)
6. 向上述上清液相中加入0.5倍体积的内毒素去除液 (例如: 1200 $\mu$ l 上清 加入600 $\mu$ l 内毒素去除液), 充分振荡混匀5min。

#### 以下分为负压法和离心法两种操作模式, 二选一

实验开始前, 请按照所需提取次数取出3号PN纯化柱, 向纯化柱中加入800 $\mu$ l PBD 平衡液, 静置孵育纯化柱5min, 5000g, 离心1min, 弃液, 备用。

#### ✧ 以下步骤是通过真空负压的操作模式 (推荐使用简石生物™负压设备及真空多连器):

1. 上述备用的 3号PN 纯化柱连接到负压真空多连器上, 倒入上述第6步的混合液, 打开真空设备, 使液体完全通过纯化柱, 多次通过直到全部混合液全部通过3号PN纯化柱。
2. 关掉真空开关, 加入800 $\mu$ l 质粒DNA洗涤液 (请先检查是否已加入乙醇!) 到3号PN纯化柱内, 打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
3. 重复步骤2 一次。
4. 将3号PN纯化柱套在2ml收集管上, 然后放置在台式离心机上在 $\geq 10,000 \times g$  条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
5. 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 质粒DNA洗脱液到纯化柱上。(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 $\geq 10,000 \times g$  离心1分钟 洗脱 质粒DNA。

#### ✧ 以下步骤是离心操作模式:

1. 上述备用的 3号PN 纯化柱套在2ml收集管上, 倒入上述第6步的混合液, 10000  $\times g$ 离心力下离心1分钟, 去除滤出液, 多次去除直到混合液 全部通过3号PN纯化柱。
2. 加入800 $\mu$ l 质粒DNA洗涤液 (请先检查是否已加入乙醇!), 10000  $\times g$ 离心力下离心1分钟, 弃掉废液。
3. 重复步骤2 一次。
4. 在 $\geq 10,000 \times g$  条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
5. 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 $\geq 10,000 \times g$  离心1分钟 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℃
	TE1008-0.6	600μl	
P1 (红)	TD4200-1-10	10ml	4℃
	TD4200-1-60	60ml	
P2	TD4200-2-10	10ml	室温
	TD4200-2-60	60ml	
P3	TD4200-3-10	10ml	室温
	TD4200-3-60	60ml	
内毒素去除液	TD4200-8-2	2ml	室温
	TD4200-8-15	15ml	
	TD4200-8-30	30ml	
PBD平衡液	TD4036-5-20	20ml	室温
	TD4036-5-55	55ml	
质粒DNA洗涤液 (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)	TC1040-5-PN	5个	室温
	TC1040-50-PN	50个	
2ml收集管	TC1001-5	5个	室温
	TC1001-50	50个	
	TC1001-200	200个	