

零内毒素质粒超大量提取试剂盒

(使用说明书 Ver.1.8.8)

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：

TD424-5 (5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
操作步骤之前需要完成	2
操作步骤	2
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	5次	保存
RNase A溶液	8*1ml	4℃
P1	2*410ml	4℃
P2	2*410ml	室温
P3	2*410ml	室温
质粒DNA结合液	2*410ml	室温
质粒DNA洗涤液1	410ml	室温
质粒DNA洗涤液2（未添加乙醇）	5*23ml 第一次使用前需按说明加指定量乙醇	室温
质粒DNA洗脱液	30ml	室温
6号PX	5个	室温
600ml漏斗	5个	室温
大型过滤器	5个	室温
3号内毒素去除柱	5个	室温
15ml漏斗X	5个	室温

注意事项

- ✧ 本产品自售出之日起提供一年质量保证。所有试剂均通过严格质量检测，确保性能稳定可靠。
- ✧ 本产品仅供专业研究人员在受控环境下使用。操作人员须佩戴防护手套及护目装置等个人防护装备，并严格遵守所在机构的安全操作规程。请注意，部分试剂可能具有刺激性，使用时需特别谨慎。
- ✧ 避免试剂长时间暴露于空气中，以防挥发、氧化或pH值变化，使用后请立即盖紧瓶盖，并按照说明书要求妥善储存。
- ✧ 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。
- ✧ 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Abs 260/280 ≥ 1.8 ，Abs 260/230 ≥ 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5~10mg质粒DNA，主要依据质粒的拷贝数，培养物成长环境等因素。
- ✧ 质粒DNA大小：最高可达200 kb。（片段长度与菌种相关）
- ✧ 洗脱体积： $\geq 2\text{ml}$ 。
- ✧ 操作温度：室温（15-30°C）。
- ✧ 操作时间：50分钟

溶液制备

1. 取出冷冻RNase A，然后将全部解冻的RNase A加到P1中（终浓度 $\geq 100\mu\text{g}/\text{ml}$ ），例如：4支1ml RNase A添加到410ml P1当中，添加RNase A后的P1在2-8°C条件下最长可保存半年。
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。
2. 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 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！
3. 溶液P2和质粒结合液可能会析出沉淀，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。

操作步骤之前需要完成：

- ✧ 取2.0L菌液，在 $\geq 3,400\text{g}$ 离心力下离心20分钟，尽可能地倒干上清，收集菌体。

操作步骤：

1. 用150ml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。）
2. 加150ml的溶液P2，温和地上下翻转数次使菌体充分裂解，直至菌液变得清透明亮，室温放置2-5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，如依然浑浊液相，证明菌液细胞量过多，超过P2裂解能力；如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步。）

3. 加150ml溶液P3（预冷），立即温和地上下翻转数次，中和完全后会出现黄色絮状沉淀。（中和完全后，溶液完全呈现为黄色，疏松质地较均匀的白色中和物，无粘稠团状物存在。）在 $\geq 3,400\text{g}$ 离心力下离心5分钟，使得尽可能多的将白色絮状物固定在瓶底。
4. 将一个大型过滤器放在口径33mm或45mm的玻璃瓶口上，然后把上一步溶液慢慢倒入过滤器内，确保过滤器完全支撑在玻璃瓶口，静置10分钟，待沉淀完全浮到溶液表面。

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）

5. 将大型过滤器和真空泵连接在一起，打开真空泵，收集到大约375-400ml的过滤液后可以关闭真空源，保存过滤液。
6. 然后在过滤液中加入150ml质粒DNA结合液，盖上盖子颠倒10次左右使其混匀。
7. 将6号PX与600ml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。
8. 关掉真空开关，加入80ml质粒DNA洗涤液1到600ml漏斗内，打开真空开关，让液体完全通过纯化柱。
9. 关掉真空开关，加入50ml质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入乙醇！）到600ml漏斗内，打开真空开关，让液体完全通过纯化柱。
10. 重复第9步。
11. 去掉600ml漏斗，将6号PX套在50ml离心管上，在 $\geq 3,400\text{g}$ 离心力下离心10分钟，以去除残留乙醇。
12. 将6号PX套在一个50ml离心管内，先添加2~3ml的质粒DNA洗脱液到柱基质上，室温放置5分钟，在 $\geq 3,400\text{g}$ 离心力下离心5分钟洗脱DNA。

以下为可选步骤：内毒素去除柱的有效使用，可能会造成质粒浓度降低，属于正常情况。

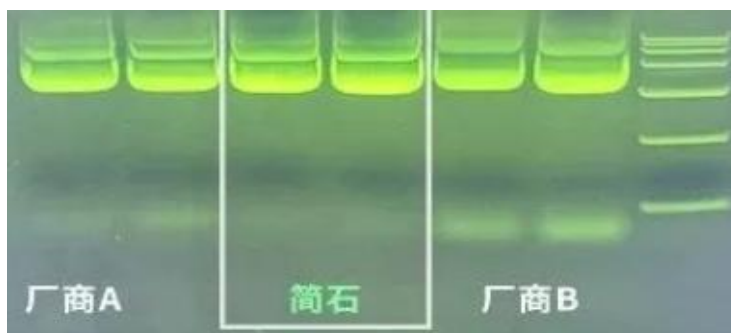
13. （如要去除内毒素则进行此步）将内毒素去除柱和15ml漏斗拧紧，然后再套在一个50ml离心管内，将上一步洗脱下来的质粒DNA全部添加到15ml漏斗内，在 $2,000\text{g}$ 的离心力下离心10分钟得到无内毒素的质粒DNA。

FAQ常见问题及解决方法

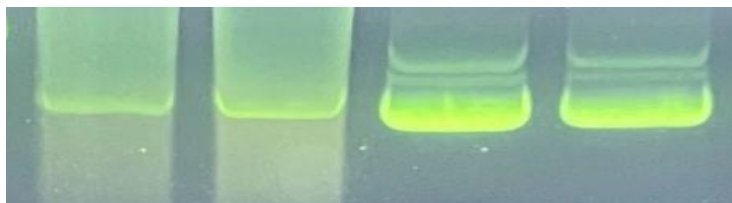
Q: 问题	A: 可能的原因和建议的解决方案
标准的菌液培养，避免杂菌污染	a) 无菌化的操作环境，具备基本的二级生物安全防护意识，培养使用设备常规消杀 (2mg/ml次氯酸或者75%无水乙醇V/V)，使用的相关耗材，采用正确的灭菌方式，如下： ✧ 普通型下排气式压力蒸汽灭菌器，压力升至103.4kPa (1.05kg/cm²) 温度达121.3℃，维持15~30分钟，可达到灭菌目的。 ✧ 严谨型脉冲真空压力蒸汽灭菌器，蒸汽压力205.8kPa (2.1kg/cm²)，温度达132℃以上并维持20分钟，即可杀死包括具有顽强抵抗力的芽孢、孢子、一切微生物。 b) 单菌落挑菌小量培养后，转大体积培养，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。 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℃。 d) 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。 e) 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℃左右的水域当中复溶后使用，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。 f) OD值对质粒提取中至关重要性：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，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) g) 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，离子交换过程中，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，例如堵纯化柱，导致得率较低。
质粒得率低或没有	

RNA 残 留
多，内毒素
超标。

- a) 过多的细胞数量会导致RNA残留过多，使得RNase A 的酶达到极值，不能消化掉更多的RNA。RNA残留过多会影响核酸浓度值，导致浓度和纯度数据不准确。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RNase A 的浓度（若杂菌过多，其RNA含量较高）。
- 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RNase A 的浓度，出厂设置的RNase A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，有效去除RNA以及多次有效使用内毒素去除柱，均可能会降低质粒总浓度，这属正常现象）
- 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RNase A 的浓度；



- ✧ 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
RNase A溶液	TE1008-1	1ml	4℃
P1	TD4200-1-410	410ml	4℃
P2	TD4200-2-410	410ml	室温
P3	TD4200-3-410	410ml	室温
质粒DNA结合液	TD4200-4-410	410ml	室温
质粒DNA洗涤液1	TD4200-5-410	410ml	室温
质粒DNA洗涤液2（未添加乙醇）	TD4200-6-23	23ml	室温
质粒DNA洗脱液	TD4200-7-30	30ml	室温
6号PX	TC1080	5个	室温
600ml漏斗	TC1033-5	5个	室温
大型过滤器	TC1035-5	5个	室温
3号内毒素去除柱	TC1051-5	5个	室温
15ml漏斗X	TC1084	5个	室温