

无内毒素质粒小提中量制备试剂盒（离心柱型）

目录号: GK2008-50 (50次)

用于小规模无内毒素质粒制备 (mini preparations)

一、试剂盒组成、储存

| 试剂盒组成 | 保存 | 50次 (GK2008-50) |
|---------------------|------|-----------------|
| RNase A | -20℃ | 250µl(10mg/ml) |
| 溶液 P1 | 4℃ | 25ml |
| 溶液 P2 | 室温 | 25ml |
| 溶液 P3 | 室温 | 40ml |
| 分离柱 A | 室温 | 50 个 |
| 去蛋白液 PE | 室温 | 27ml |
| 漂洗液 WB [△] | 室温 | 15ml |
| 洗脱缓冲液 EB | 室温 | 15 ml |
| 吸附柱 AC6 | 室温 | 50 个 |
| 纯化柱 ED | 室温 | 50 个 |
| 收集管 (2ml) | 室温 | 50 个 |

△: 第一次使用前按说明加指定量乙醇

注意事项

- 第一次使用时, 将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 4℃ 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留, 这时可在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 45ml 无水乙醇, 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!
- 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀, 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。

二、原理简介

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞, 离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 PH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA, 再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除, 最后低盐、高 PH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。清除内毒素效果 < 0.1EU/ug。
- 独有的去蛋白液配方, 可以高效去除残留的核酸酶, 即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除。有效防止了质粒被残留的核酸酶降解。

- 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, 可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

- 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机, 如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
- 溶液 P3 和去蛋白液 PE 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。
- 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒建议接种单菌落于 5-15ml 加合适抗生素的 LB 培养基, 过夜培养 14-16 个小时, 可提取出 20-70µg 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒, 应适当加大菌体使用量。
- 得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD260 值为 1 相当于大约 50 µg/ml DNA。电泳可能为单一条带, 也可能为 2 条或者多条 DNA 条带, 这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成, 与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。
- 要知道质粒 DNA 确切分子大小, 必须酶切线性化后, 对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒泳动位置不确定, 是无法通过电泳知道确切大小的。
- 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA, 不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱, 但应该确保 PH 大于 7.5, PH 过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在 -20℃。质粒 DNA 如果

需要长期保存, 可以用TE缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, PH 8.0), 但是EDTA可能影响下游酶切反应, 使用时可以适当稀释。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 45ml 无水乙醇!

* 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8℃ 保存。

- 取 5-15ml 过夜培养的菌液, 13000rpm 离心 60 秒, 弃上清, 收集菌体, 尽可能的倒干上清。
本操作可以用 2ml 离心管多次操作或者 15ml 离心管一次操作。
- 用 500 μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 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。
- 加 500 μl 的溶液 P2, 温和地上下翻转 6-10 次使菌体充分裂解, 直到溶液变得清亮。
温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免基因组 DNA 剪切断裂! 使用时不应超过 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。
- 加 800 μl 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 6-10 次, 室温放置 5 分钟。室温 13,000 rpm 离心 10 分钟, 小心取上清。
- 将所得上清溶液分次转入分离柱 A (分离柱 A 放入收集管中), 12000rpm 离心 1 分钟, 弃掉分离柱 A, 取收集管中离心得到的溶液。

- 上一步所得上清液分次加入吸附柱 AC6 中 (吸附柱 AC6 放入收集管中), 13,000rpm (~17,900×g) 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液。
- 加入 500 μl 去蛋白液 PE, 13,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃滤液。
此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质, 如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株, 核酸酶含量丰富, 应加此步骤; 如所用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5α 等缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 则可略过此步骤。
- 加入 500 μl 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 13,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃滤液。
- 重复步骤 8 一次, 13,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃滤液。空柱 13,000 rpm 离心 2 分钟。室温放置 3-5 分钟, 除去残留乙醇。
- 取出吸附柱 AC6, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 100-300 μl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70℃ 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 13,000 rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA。
- 将下滤液加入到纯化柱 ED 中, 室温放置一分钟, 13,000rpm 离心一分钟洗脱 DNA, 可立即用于下游分子实验或-20℃ 保存。
洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 50 μl, 体积小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

| 出现的问题 | 可能的原因 | 建议解决方法 |
|-------------------|---|--|
| 质粒 DNA 产量低 | 培养基中忘加抗生素, 非质粒转化细胞过度生长 | 确保固体, 液体培养基中都加入了适当的抗生素。 |
| | 细菌培养时间太长, 老化细菌开始裂解 | 接种过夜培养板的新鲜单菌落于加了合适抗生素的培养基中培养 12-16 个小时。 |
| | 使用了低拷贝数质粒 | 建议使用高拷贝数质粒, 低拷贝数质粒应该适当加大处理体积。 |
| | 细菌培养时间过短, 菌液内细菌浓度过低 | 细菌培养到[A ₆₀₀]吸光值为 2-4 的时候收集菌体。 |
| 未提取到质粒 DNA | 漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇 | 第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。 |
| | 质粒洗脱液含有较多乙醇, 琼脂糖电泳/EB 染色定量时质粒 DNA 漂出上样孔 | 确保已经做了步骤 9, 将离心吸附柱的乙醇残留去除; 或者适当提高上样缓冲液浓度。 |
| 产物中含有 RNA 污染 | 第一次做实验时候, 忘记将 RNase A 加入 P1 溶液, RNase A 失活或者起始处理量过量 | 第一次实验前确保将 RNase A 加入了溶液 P1; P1 溶液超过 3 个月的, 可加入一些新 RNase A 在溶液 P1; 处理量不要过量; 菌体重悬于 P1 溶液后可放置几分钟让 RNase A 充分起作用后再进行下一步。 |
| 质粒 DNA 不能酶切或酶切不完全 | 忘记做步骤 9, 乙醇抑制了酶切反应 | 做步骤 9, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。 |
| | 一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应 | 将洗脱的质粒 DNA 溶液 13, 000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用, |
| 基因组 DNA 污染 | 在裂解时基因组被剪切打断了 | 做步骤 3 时轻柔的通过颠倒混匀, 不要涡旋或者剧烈震荡。 |

Product Use Limitation:

This product is developed, designed and sold exclusively for research purpose and in vitro use only.