

# 无内毒素质粒大量制备试剂盒（离心柱型）

目录号: GK2009-5（5次）

用于大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	5次（GK2009-5）
RNase A	-20℃	400μl(10mg/ml)
溶液 P1	4℃	50ml
溶液 P2	室温	50ml
溶液 P3	室温	75ml
去蛋白液 PE	室温	50ml
漂洗液 WB <sup>△</sup>	室温	25ml
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AC	室温	5个
纯化柱 ED	室温	5个
收集管（50ml）	室温	5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漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，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，粗提物选择性结合离心柱，然后离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 PH 值状态下选择性的结合溶液中的质粒 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。
- 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。

- 独特内毒素清除配方，清除内毒素效果一般 < 0.1EU/ug。
- 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！）

- 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm，带 50ml 转头的台式离心机。
- 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。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，同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量，洗脱缓冲液应在 70℃ 预热。适当延长吸附和洗脱的时间。
- 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。

1. 取 100-500ml 过夜培养的菌液, 8000rpm 离心 5-10min, 弃上清, 收集菌体, 尽可能的倒干上清。

处理超过 1.5 毫升菌液可以离心弃上清后, 在同一个 50ml 管内加入更多的菌液, 重复步骤 1, 直到收集到足够的菌体。

2. 用 9ml 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。

3. 加 9ml 的溶液 P2, 温和地上下翻转 6-10 次使菌体充分裂解, 室温放置 4min, 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! 所用时不应超过 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。

4. 加 14.4ml 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 6-10 次, 充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。室温放置 5min。室温 10,000 rpm 离心 15min, 小心取上清。

5. 取上清, 加入 10ml 无水乙醇, 轻轻混匀, 不要剧烈震荡。

6. 将步骤 5 所得上清液加入吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中), 每次转移 10ml (沿柱内壁加入, 以免冲破吸附膜, 下同), 10,000rpm 离心 3min, 弃滤液; 重复操作直至所有溶液全部过滤完毕。

7. 加入 10ml 去蛋白液 PE, 10,000rpm 离心 5min, 弃掉废液。

8. 加入 10ml 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!), 10,000 rpm 离心 3min, 弃滤液。

9. 重复步骤 8 一次, 10,000 rpm 离心 3min, 弃滤液。空柱 10,000 rpm 离心 5min, 除去残留乙醇。

10. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 1-1.5ml 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70℃ 水浴中预热), 室温放置 1 分钟, 13,000 rpm 离心 3min, 洗脱 DNA。

11. 将下滤液加入到纯化柱 ED 中 (柱容 750ul, 洗脱液可分两次过柱), 13,000rpm 离心 1min。收集滤液, 滤液中含 DNA, 可立即用于下游分子实验或-20℃ 保存。

**注意: 洗脱缓冲液 EB 组分为低浓度 Tris-HCl (pH8.0), 不影响测序和酶切反应。把水或洗脱液加热至 60℃ 以上使用有利于提高洗脱液效率。**

## 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 <sub>600</sub> ]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	<b>第一次实验时, 在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</b>
	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, <b>不要涡旋或者剧烈震荡。</b>

### Product Use Limitation:

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