

## 无内毒素质粒大量提取试剂盒说明书

货号: D1150

规格: 10T

保存: 常温干燥保存, 复检期为一年。

试剂盒内容:

试剂盒组成	D1150-10T
RNase A	1ml
内毒素清除剂	100ml
溶液 P1	40ml
溶液 P2	40ml
溶液 P3	40ml
溶液 P4	120ml
漂洗液	15×2ml
洗脱液	30ml
吸附柱	10 个
收集管	20 个
说明书	1 份

**注意:** 使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶体上的标签。溶液 P1 在使用前先加入 RNaseA (将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入), 混匀, 置于 2-8℃ 保存。如非指明, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

### 产品说明:

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞, 根据离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA 的原理特异性提取质粒 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附 DNA, 可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。Solarbio 公司研制的内毒素清除剂, 可最大限度地除去内毒素。从 50-100ml 大肠杆菌 LB 培养液中, 可快速提取 200-300µg 高纯度高拷贝的质粒 DNA, 提取率达 85-90%。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 纯度高, 可直接用于细胞转染等要求较高的实验, 以及其他各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。

### 操作步骤:

- 1、取 50-100ml 细菌培养物, 11000rpm 离心 1min, 尽量吸除上清 (菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。
- 2、向留有菌体沉淀的离心管中加入 4ml 溶液 P1(请先检查是否已加入 RNaseA), 使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意: 如果菌块未彻底混匀, 会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。
- 3、向离心管中加入 4ml 溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意: 混匀一定要温和, 以免污染细菌基因组 DNA, 此时菌液应变得清亮粘稠, 作用时间不要超过 5 min, 以免质粒受到破坏。

- 4、向离心管中加入 4ml 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。11000rpm 离心 10 min，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，尽量不要吸出沉淀。注意：溶液 P3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
- 5、加入上清 1/5 体积的冰上预冷的内毒素清除剂，振荡混匀，溶液变浑浊，冰浴 2min 至溶液变清亮。
- 6、37℃水浴 5min,不时振荡，溶液又变浑浊。11000rpm 室温离心 5min，溶液应分为两相，上层水相含质粒 DNA，下层油相含内毒素。
- 7、将含质粒 DNA 的上层水相转移至新管，弃下层油相，注意不要吸入油状相。重复抽提三次，即重复步骤 5-7 三次。
- 8、加入 12ml 的溶液 P4，充分混匀后加入吸附柱中，室温放置 2min，11000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。如果溶液量多可分多次加入。
- 9、向吸附柱中加入 7ml 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，11000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
- 10、向吸附柱中加入 7ml 漂洗液，11000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
- 11、11000rpm 离心 3min，弃废液，将吸附柱敞口置于室温或 50℃温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR 等。
- 12、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 1-2ml 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 5min，11000rpm 离心 2min。
- 13、为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 5min，11000rpm 离心 2min。

#### 注意事项:

1. 使用前请先检查溶液 P2、P3 和 P4 是否出现混浊，如有混浊现象，可在 37℃水浴中加热几分钟，待溶液恢复澄清后再使用。
2. 洗脱缓冲液体积不应少于 500ul，体积过小影响回收效率;洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率，DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。
3. 质粒 DNA 浓度 > 1mg/ml 时清除内毒素效率降低。由于质粒 DNA 本身的性质，清除过程可导致部分质粒 DNA 丢失，但内毒素却能得到最大限度清除。
4. 所有溶液应用无内毒素的高纯水配制，所有器械材料均应不含内毒素，玻璃器皿可高温烘烤，非挥发性水溶液可高压处理。
5. DNA 浓度及纯度检测：得到的质粒 DNA 纯度与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的 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。DNA 应在 OD<sub>260</sub> 处有显著吸收峰，OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50μg/ml 双链 DNA、40μg/ml 单链 DNA。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响吸光值，但并不表示纯度低。

#### 相关产品:

- E1020 EB 染色液
- M1070 D2000 plus DNA Ladder
- D1010 6×DNA Loading Buffer
- T1060 50×TAE 缓冲液
- T1050 5×TBE 缓冲液
- G8142 GoldView II 型核酸染色剂(5000×)

