

# 无内毒素高纯度质粒大量快速提取试剂盒



## 产品信息：

| 试剂盒组成             | 保存   | DP108-01<br>10 次                |
|-------------------|------|---------------------------------|
| 平衡液 BL            | 室温   | 30ml                            |
| RNase A (50mg/ml) | -20℃ | 1ml                             |
| 溶液 P1             | 4℃   | 100ml                           |
| 溶液 P2             | 室温   | 100ml                           |
| 溶液 P4             | 室温   | 100ml                           |
| 漂洗液 WB            | 室温   | 25ml x 2<br>第一次使用请加入 100ml 无水乙醇 |
| 洗脱缓冲液 EB          | 室温   | 30ml                            |
| 过滤器 CS1           | 室温   | 10 个                            |
| 吸附柱 CP6           | 室温   | 10 个                            |
| 收集管 (50ml)        | 室温   | 20 个                            |

## 保存条件：

该试剂盒置于室温(15-25℃)干燥条件下，可保存 12 个月，更长时间的保存可置于 2-8℃。2-8℃保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在 37℃水浴中预热 10 min，以溶解沉淀。第一次使用前将 RNase A 加入溶液 P1 中，混匀后置于 2-8℃保存，可稳定保存 12 个月以上。单独包装的 RNase A 在室温可稳定保存 12 个月以上。

## 产品介绍：

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒 DNA，同时采用特殊的溶液 P4 和过滤器 CS1，可有效地去除内毒素和蛋白等杂质，整个提取过程方便快捷，仅需 1h。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规实验，包括酶切、PCR、测序、连接、转化和细胞转染等。

推荐每次培养基使用量：高拷贝质粒推荐使用量为 100 ml，得率一般在 500-1500 µg

左右；低拷贝质粒推荐使用量为 200 ml，得率一般在 200-600  $\mu\text{g}$  左右。

### 产品特点：

1. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。从 100~200ml 大肠杆菌 LB 培养液中，可快速提取 0.2~0.4mg 高质量的高拷贝质粒，提取率达 80~90%。
2. 获得的质粒产量高，超螺旋比例高，纯度好，可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序和转染等各种分子生物学实验。

### 注意事项：

- 1 溶液 P1 在使用前先加入 RNase A（将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入），混匀，置于 2-8℃ 保存。
- 2 使用前先检查平衡液 BL、溶液 P2 和 P4 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在 37℃ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
- 3 注意不要直接接触溶液 P2 和 P4，使用后应立即盖紧盖子。
- 4 使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出，避免滤膜因压力而松动。
- 5 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 10 kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、P4 的用量；洗脱缓冲液推荐在 65-70℃ 水浴中预热。可以适当延长吸附和洗脱时间，以提高提取效率。
- 6 实验前使用平衡液 BL 处理吸附柱，可以最大限度激活硅基质膜，提高得率。
- 7 用平衡液处理过的柱子最好立即使用，放置时间过长会影响使用效果。

### 操作步骤：

使用前请先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 CP6 中（吸附柱放入 50ml 收集管中）加入 2.5 ml 的平衡液 BL，8,000 rpm (~8,228×g) 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（用平衡液处理过的柱子最好立即使用）。
2. 取 100ml（根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用 200 ml）过夜培养的菌液加入离心管，室温 8,000 rpm (~8,228×g) 离心 3 min 收集细菌，尽量吸除上清。

**注意：**菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌液量以能够充分裂解为佳，菌液过多会导致裂解不充分从而降低质粒的提取效率。

3. 尽量吸除上清，为确保上清液全部吸取，请用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。
4. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 8 ml 溶液 P1（请先检查是否已加入 RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

**注意：**请务必彻底悬浮细菌沉淀，如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解效果，导致提取量和纯度偏低。对于低拷贝质粒，加大菌体用量的同时按比例增加 P1、P2 和 P4 的用量。

5. 向离心管中加入 8ml 溶液 P2，立即温和地上下翻转 6-8 次，使菌体充分裂解，室温放置 5 min。

**注意：**温和地混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

6. 向离心管中加入 8 ml 溶液 P4，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置 10 min 左右，8,000 rpm (~8,228×g) 离心 5-10 min，使白色沉淀离至管底（可适当增加离心时间），将全部溶液小心倒入过滤器 CS1 中（请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器），慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的 50 ml 的管中（自备）。

**注意：**加入溶液 P4 后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤器 CS1 中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多（>100 ml），推荐延长离心时间至 20-30 min。

7. 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇（加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染），上下颠倒混匀后转移到吸附柱 CP6 中（吸附柱放入 50 ml 收集管中）。

**注意：**过滤后滤液会损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱 CP6 的最大容积为 15 ml，所以需要分两次过柱。个别情况下离心机转子倾角较大，此时，建议加入吸附柱 CP6 的溶液体积不超过 10 ml，以防产生漏液现象。

8. 室温 8,000 rpm (~8,228×g) 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP6 重新放回收集管中。

**注意：**将第 7 步中所得溶液分两次过柱，每次均按以上条件操作。

9. 向吸附柱 CP6 中加入 10 ml 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇），8,000 rpm (~8,228×g) 离心 2 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

10. 重复操作步骤 9。

11. 向吸附柱 CP6 中加入 3 ml 无水乙醇，室温 8,000 rpm (~8,228×g) 离心 2 min，倒掉废液。

12. 将吸附柱 CP6 重新放回收集管中，8,000 rpm (~8,228×g) 离心 5 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

**注意：**漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）实验。为确保

下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱 CP6 开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

13. 将吸附柱 CP6 置于一个干净的 50 ml 收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 1-2 ml 洗脱缓冲液 EB，室温放置 5 min，然后室温 8,000 rpm (~8,228×g) 离心 2 min。将 50 ml 离心管中的洗脱液全部移入一个干净的 1.5 ml 离心管，-20℃ 保存。

**注意：**为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 13。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH<sub>2</sub>O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.5-8.0 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量的多少主要是依据质粒的拷贝数 以及实验所需要的浓度来确定。洗脱缓冲液体积不少于 1 ml，体积过小影响回收效率。DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

**可选步骤（如果需要更高浓度的质粒，可进行如下操作）：**

14. 每 1 ml 洗脱液加入 1.42 ml 异丙醇以及 0.42 ml 5M NaCl (客户自备)，混匀，室温放置 5 min，8,000 rpm (~8,228×g) 离心 10 min，小心弃上清。

15. 加入 0.5 ml 的 70% 乙醇洗涤沉淀，室温 8,000 rpm (~8,228×g) 离心 5 min，小心弃乙醇。

16. 重复操作步骤 15。

17. 空气中干燥 DNA 沉淀 5-10 min，根据需要适当用适当体积的 EB 缓冲液溶解沉淀。

BM201215