

## 无内毒素质粒小量提取试剂盒说明书

货号：AC11001

规格：50T/100T

保存：酶附件-20℃，内毒素清除剂4℃，其它试剂RT, 复检期一年

试剂盒内容：

| 试剂盒组成   | AC11001-50T | AC11001-100T |
|---------|-------------|--------------|
| RNase A | 300ul       | 500ul        |
| 内毒素清除剂  | 20ml        | 40ml         |
| 溶液 P1   | 10ml        | 20ml         |
| 溶液 P2   | 10ml        | 20ml         |
| 溶液 P3   | 10ml        | 20ml         |
| 溶液 P4   | 30ml        | 60ml         |
| 漂洗液     | 15ml        | 15ml×2       |
| 洗脱液     | 15ml        | 30ml         |
| 吸附柱     | 50 个        | 100 个        |
| 收集管     | 50 个        | 100 个        |
| 说明书     | 1 份         | 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。ACMEC 公司研制的内毒素清除剂，可最大限度地除去内毒素。从 1-5ml 大肠杆菌 LB 培养液中，可快速提取 5-15μg 高纯度质粒 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 1-5ml 细菌培养物，12000rpm 离心 1min，吸除上清（菌液浓度较低时可多次离心收集到一个离心管中）。
- 2、向留有菌体沉淀的离心管中加入 200μl 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 200ul 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 200ul 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。12000rpm



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。12000rpm 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。重复步骤 5-7 三次。

8、加入 600ul 的溶液 P4，充分混匀后加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 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 600ul 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

10、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

11、12000rpm 离心 2min，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 50-200ul 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

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 2min，12000rpm 离心 1min。

#### **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 50ul，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。