

无内毒素质粒大量提取试剂盒说明书

货号：AC11002

规格：10T

保存：酶附件-20℃，内毒素清除剂4℃，其它试剂RT, 复检期为一年。

试剂盒内容：

试剂盒组成	AC11002-10T
RNase A	1ml
内毒素清除剂	100ml
溶液 P1	40ml
溶液 P2	40ml
溶液 P3	40ml
结合液	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。ACMEC 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°C 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 的结合液, 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°C 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°C 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 和结合液是否出现混浊, 如有混浊现象, 可在 37°C 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°C, 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 OD₂₆₀ 处有显著吸收峰, OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50μg/ml 双链 DNA、40μg/ml 单链 DNA。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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。