



# 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 (干粉) | 室温 | 1 支                             |
| 溶液 P1        | 4℃ | 100ml                           |
| 溶液 P2        | 室温 | 100ml                           |
| 溶液 P4        | 室温 | 100ml                           |
| 去蛋白液 PD      | 室温 | 100ml                           |
| 漂洗液 WB       | 室温 | 25ml × 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:

收到本产品后按照上面指示温度存放各成份, 储存 18 个月不影响使用效果。

## 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  $\mu\text{g}$  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。

#### **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。为确保上清液全部吸取，可用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。

**注意：**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，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. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 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。

7. 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 6 步中所得溶液分两次过柱，每次均按以上条件操作。

8. 向吸附柱 CP6 中加入 8 ml 去蛋白液 PD，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。

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乙醇去除。

**注意：**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乙醇。

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 收集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 11。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。

BM250424