

高纯度质粒小量提取试剂盒

使用说明书 (Ver.1.4.0)

产品特点

- ✧ 独有的显色反应，可以直接观察到细胞裂解中和的程度，极大方便操作者判断其状态。
- ✧ 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好，内毒素含量极低，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染、体内细胞等各种敏感的分子生物学实验。
- ✧ 此产品仅供科研使用。

产品货号:

TD429-100 (100 次反应) TD429-200 (200 次反应) TD429-400 (400 次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

目录 Contents

产品组份	1
注意事项	1
产品特性	2
溶液制备	2
操作步骤	2
✧ 负压操作步骤	3
✧ 离心操作步骤	3
组件查询	4

产品组份

试剂盒组成	100 次	200 次	400 次	保存
RNase A 溶液	300μl	600μl	2*600μl	4℃
P1	30ml	60ml	2*60ml	4℃
P2	30ml	60ml	2*60ml	室温
P3	30ml	60ml	2*60ml	室温
质粒 DNA 结合液	30ml	60ml	2*60ml	室温
质粒 DNA 洗涤液 1	2*55ml	3*55ml	6*55ml	室温
质粒 DNA 洗涤液 2 (未添加乙醇)	23ml	2*23ml	4*23ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇			
质粒 DNA 洗脱液	10ml	10ml	20ml	室温
2 号 PX 纯化柱 (带盖)	100 个	200 个	400 个	室温
2ml 收集管	100 个	200 个	400 个	室温
2ml 收集管 (带盖)	100 个	200 个	400 个	室温

注意事项

1. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出沉淀，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
3. 溶液 P3 和结合液中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

产品特性

- ✧ DNA 纯度：获得的质粒产量高、纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染等各种分子生物学实验：一般情况 $\text{Abs } 260 / 280 \geq 1.8$ ， $\text{Abs } 260 / 230 \geq 2.0$ ，内毒素含量 $\leq 1\text{EU}/\mu\text{g}$ 。
- ✧ 质粒 DNA 产量：每次可提取到约 100 μg ，主要依据质粒的拷贝数，培养物的成长环境等因素。
- ✧ 质粒 DNA 大小：最高可达 25 kb。
- ✧ 洗脱体积： $\geq 25 \mu\text{l}$ 。
- ✧ 操作温度：室温 (15-30°C)。
- ✧ 操作时间： ≤ 15 分钟

溶液制备：（使用之前需要配制）

1. 第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）置于 2-8°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
2. 10 次反应的质粒 DNA 洗涤液 2，应添加 20 ml 95%的乙醇到 5ml 的质粒 DNA 洗涤液 2 中。100/200 次反应的质粒 DNA 洗涤液 2，应添加 88 ml 95%的乙醇到 23ml 的质粒 DNA 洗涤液 2 中加入后请及时在方框内打钩标记，以免多次加入！
3. P3 在使用前需要在冰上预先冷却。

操作步骤

1. 取 0.5-5ml 过夜培养的菌液转移到 2ml 带盖收集管中，全速离心力下离心 15-20 秒，尽可能多的去除上清，收集菌体。
2. 用 250 μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，可用吸头反复吹打或涡旋振荡至彻底悬浮。（如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。）
3. 加 250 μl 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 2-3 分钟。（温和地混合，不要剧烈振荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步。）
4. 加 250 μl 溶液 P3（预冷），立即温和地上下翻转 3-4 次，中和完全后会出现黄色絮状沉淀。（中和完全后溶液呈现黄色）。
5. 将上述中和的裂解物在冰上孵育 5 分钟。然后在 16,000 $\times g$ 的离心力下离心 5 分钟。
6. 将步骤 5 中的 600 μl 上清转移到干净的 1.5ml 离心管内。（不要碰到下面的黄色沉淀）。
7. 然后在 1.5ml 离心管内加入 260 μl 质粒 DNA 结合液，盖上盖子颠倒 8 次左右使其混匀。

以下步骤可以通过真空负压的方式也可以通过离心的方式进行操作（负压设备所用真空多连器推荐美国 ZYMO RESEARCH 公司）

负压操作步骤：

1. 将 2 号 PX 纯化柱连接到负压真空多连器上,倒入第 7 步的混合液,打开真空开关使液体完全通过纯化柱。
2. 关掉真空开关,倒入 800 μ l 质粒洗涤液 1 到 2 号 PX 纯化柱内,打开真空开关,让液体完全通过纯化柱。
3. 关掉真空开关,加入 800 μ l 质粒 DNA 洗涤液 2 (请先检查是否已加入无水乙醇!)到 2 号 PX 纯化柱内, 打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
4. 关掉真空开关,加入 200 μ l 质粒 DNA 洗涤液 2 到 2 号 PX 纯化柱内, 打开真空开关,让液体完全通过纯化柱。
5. 将 2 号 PX 纯化柱套在 2ml 收集管上,然后放置在台式离心机上在 $\geq 10,000$ xg 条件下空转 2 分钟以去除残留乙醇。
6. 将 2 号 PX 纯化柱套在一个干净的 1.5ml 离心管内,添加 25 μ l-50 μ l 的质粒 DNA 洗脱液到纯化柱基质上。(洗脱液事先在 65-70°C 水浴中预热,洗脱效果更好),室温放置 2 分钟,在 $\geq 10,000$ xg 条件下离心 1 分钟来洗脱质粒 DNA。

离心操作步骤：

1. 将 2 号 PX 纯化柱套在 2ml 收集管上,倒入第 7 步的混合液, 5000 xg 离心力下离心 1 分钟,去除滤出液。
2. 加入 800 μ l 质粒洗涤液 1 , 5000 xg 离心力下离心 1 分钟,弃掉废液。
3. 加入 800 μ l 质粒 DNA 洗涤液 2 (请先检查是否已加入无水乙醇!) , 5000 xg 离心力下离心 2 分钟,弃掉废液。
4. 加入 200 μ l 质粒 DNA 洗涤液 2 , 5000 xg 离心力下离心 1 分钟, 弃掉废液。
5. 在 $\geq 10,000$ xg 条件下空转 2 分钟以去除残留乙醇。。
6. 将 2 号 PX 纯化柱套在一个干净的 1.5ml 离心管内,添加 25 μ l-50 μ l 的质粒 DNA 洗脱液到纯化柱基质上。(洗脱液事先在 65-70°C 水浴中预热,洗脱效果更好),室温放置 2 分钟,在 $\geq 10,000$ xg 条件下离心 1 分钟来洗脱质粒 DNA。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
RNase A 溶液	TE1008-0.6	600μl	4℃
	TE1008-0.3	300μl	
P1	TD4200-1-30	30ml	4℃
	TD4200-1-60	60ml	
P2	TD4200-2-30	30ml	室温
	TD4200-2-60	60ml	
P3	TD4200-3-30	30ml	室温
	TD4200-3-60	60ml	
质粒 DNA 结合液	TD4200-4-30	30ml	室温
	TD4200-4-60	60ml	
质粒 DNA 洗涤液 1	TD4200-5-55	55ml	室温
质粒 DNA 洗涤液 2（未添加乙醇）	TD4200-6-23	23ml	室温
质粒 DNA 洗脱液	TD4200-7-10	10ml	室温
	TD4200-7-20	20ml	
2 号 PX 纯化柱（带盖）	TC1086-50-C	50 个	室温
2ml 收集管	TC1001-50	50 个	室温
	TC1001-200	200 个	
2ml 收集管（带盖）	TC1001-50-C	50 个	室温
	TC1001-200-C	200 个	