

质粒DNA超快速大量提取试剂盒

使用说明书 (Ver.0.0.2)

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 ($\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$)，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分子生物学实验。
- ✧ 此产品仅供科研使用。

产品货号：

TD423-2 (2 次反应) TD423-10 (10 次反应) TD423-20 (20 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
FAQ 常见问题及解决方法	4
组件查询	6

产品组份

试剂盒组成	2 次	10 次	20 次	保存
RNaseA 溶液	300μl	1ml+600μl	2* (1ml+600μl)	4℃
P1	30ml	150ml	2*150ml	4℃
P2	30ml	150ml	2*150ml	室温
P3	50ml	2*150ml	4*150ml	室温
质粒 DNA 洗涤液 1	22ml	55ml	2*55ml	室温
质粒 DNA 洗涤液 2	6ml	23ml	2*23ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇			
质粒 DNA 洗脱液	5ml	30ml	60ml	室温
6 号纯化柱+50ml 漏斗	2 个	10 个	20 个	室温
注射器内芯	2 个	10 个	20 个	室温
注射器外套	2 个	10 个	20 个	室温
50ml 螺旋盖尖底离心管	4 个	20 个	40 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 OD 值、质粒拷贝数等因素有关，过多的菌液并不能带来更高的质粒产量，反而有可能影响裂解能力，使浓度和纯度都有所降低，菌液的细胞数量严格按照 OD 值的标准操作，并且符合菌液上样量。
5. 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分子生物学实验。

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 $Abs_{260}/_{280} \geq 1.8$ ， $Abs_{260}/_{230} \geq 2.0$ 。
- ✧ 质粒 DNA 产量：每次可提取到约 800 μ g，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 200kb。（片段长度不同与菌种相关）
- ✧ 洗脱体积： ≥ 1.5 ml。
- ✧ 操作温度：室温（15-30 $^{\circ}$ C）。
- ✧ 操作时间：产品操作步骤极简，仅 P1、P2、P3 反应后可释放细胞中的质粒，即刻直接通过质粒结合柱，全套步骤时间 仅 ≤ 8 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 RNaseA 加入溶液 P1 后（终浓度 $\sim 200\mu$ g/ml）置于 4 $^{\circ}$ C 保存。如果溶液 P1 中 RNaseA 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNaseA 即可。
2. 试用装的质粒 DNA 洗涤液 2 请按照瓶体标注体积添加。
质粒 DNA 洗涤液 2 应添加 88ml 无水乙醇到 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！

操作步骤

1. 取 150ml 过夜培养的菌液，OD 值 ≤ 5 ，在 $\geq 5000g$ 离心力下离心 5 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
2. 用 14ml 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 14ml 的溶液 P2，温和地上下翻转数次使菌体充分裂解，室温放置 ≤ 5 分钟。
（温和地混合，不要剧烈振荡，以免环状质粒剪切断裂！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 23ml 的溶液 P3，温和地上下翻转数次，直到中和完全后，会出现白色絮状沉淀。（中和物应蓬松均匀，无黏性团状物等状态，中和完全后溶液呈现黄色），在 $\geq 5000g$ 离心力下离心 5~10 分钟。
5. 将一个 50ml 离心管放在离心管架子上准备收集过滤液，把注射器下端的接头拧开，将上一步上清慢慢倒入注射器内，将注射器推杆推入注射器内慢慢推动收集过滤液。

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 所用真空泵，及真空多连器推荐使用 简石生物™技术有限公司设备产品）

负压操作步骤：

1. 确认 6 号 P 纯化柱（连接 50ml 漏斗）连接紧密后放置在负压多连器上，倒入第 5 步的混合液，打开真空开关使液体完全通过纯化柱。
2. 去掉 50ml 漏斗。
3. 关掉真空开关，加入 5ml 质粒洗涤液 1，打开真空开关，让液体通过纯化柱。
4. 关掉真空开关，加入 10ml 质粒 DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇！），打开真空开关让液体完全通过纯化柱。
5. 将 6 号 P 纯化柱套在 50 ml 离心管上，离心 $\geq 5000\times g$ 条件下空转 2 分钟以去除残留乙醇。
6. 将 6 号 P 纯化柱套在一个干净的 50ml 离心管内，添加 1.5ml ~ 3ml 的质粒 DNA 洗脱液到纯化柱基质上，（洗脱液事先在 65°C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10000\times g$ 条件下离心 2 分钟来洗脱质粒 DNA。

推荐：使用 2ml 的洗脱体积，可以比较均匀的浸透 6 号纯化柱。

将洗脱后的质粒 DNA 液体加回到纯化柱基质上，二次洗脱可以提高产量。

如果觉得最后的浓度较低， 推荐使用简石生物™ 通用核酸浓缩纯化试剂盒 货号：

TD434，可有效的提高核酸浓度，回收率可达 95%。

离心操作步骤：

1. 确认 6 号 P 纯化柱放置在一个 50ml 离心管里，倒入第 5 步的混合液，1000 $\times g$ 离心力下离心 2 分钟，倒掉离心管中的滤出液，重复此步骤直到过滤液全部倒净。
2. 加入 5ml 质粒 DNA 洗涤液 1，1000 $\times g$ 离心力下离心 2 分钟，弃废液。
3. 加入 10ml 质粒 DNA 洗涤液 2（请先检查是否已加入无水乙醇！），1000 $\times g$ 离心力下离心 2 分钟，弃掉废液。
4. 将 6 号 P 纯化柱套在 50 ml 离心管上，离心 $\geq 5000\times g$ 条件下空转 2 分钟以去除残留乙醇。
5. 将 6 号 P 纯化柱套在一个干净的 50ml 离心管内，添加 1.5ml ~ 3ml 的质粒 DNA 洗脱液到纯化柱基质上，（洗脱液事先在 65°C 水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置 2 分钟，在 $\geq 10000\times g$ 条件下离心 2 分钟来洗脱质粒 DNA。

推荐：使用 2ml 的洗脱体积，可以比较均匀的浸透 6 号纯化柱。

将洗脱后的质粒 DNA 液体加回到纯化柱基质上，二次洗脱可以提高产量。

如果觉得最后的浓度较低， 推荐使用简石生物™ 通用核酸浓缩纯化试剂盒 货号：

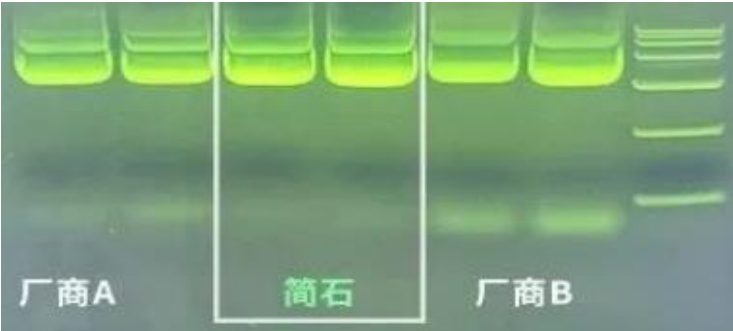
TD434，可有效的提高核酸浓度，回收率可达 95%。

FAQ常见问题及解决方法

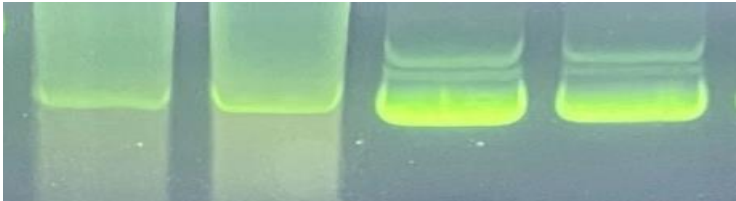
Q：问题		A：可能的原因和建议的解决方案	
标准的菌液培养，避免杂菌污染		a) 无菌化的操作环境，具备基本的二级生物安全防护意识，培养使用设备常规消杀（2mg/ml 次氯酸或者 75%无水乙醇 V/V），使用的相关耗材，采用正确的灭菌方式，如下： ✧ 普通型下排气式压力蒸气灭菌器，压力升至 103.4kPa（1.05kg/cm²）温度达 121.3℃，维持 15~30 分钟，可达到灭菌目的。 ✧ 严谨型脉冲真空压力蒸气灭菌器，蒸气压力 205.8kPa（2.1kg/cm²），温度达 132℃以上并维持 20 分钟，即可杀死包括具有顽强抵抗力的芽孢、孢子、一切微生物。 b) 挑取单菌落少量培养后转大体积培养，注意溶氧量的问题，培养总体积不要过大，一般为培养瓶的 20%体积，使用透气性好的封瓶膜，转数 200rpm~250rpm。 c) 注意杂菌生长问题，菌落是否正常生长，正确的选用抗生素不可忽略，培养基的 PH=7.2，培养时间 8~16H 温控在 37℃。	
		a) 部分质粒本身不稳定，不能频繁转接，或造成质粒丢失，每次接种应接种单菌落，另外选用的抗生素的浓度是否正确。 b) 质粒抽提试剂使用不当：P2 在温度较低的情况下会出现浑浊，降低对细胞膜的裂解效率，使得质粒产量低，立即将试剂置于 37℃左右的水浴当中复溶后使用，正确的细胞数量裂解后应呈现粘稠透亮的液相。仍现部分浑浊现象为少量大肠杆菌细胞未能裂解。 c) OD 值对质粒提取的至关重要性：最佳性能提取及最佳吸光值，细胞数量保持 OD 值=5，可选择自然过夜培养的菌液，稀释约十倍左右，或自行稀释最佳性能的 OD 值。（OD 值是细胞数量，与说明书当中的标注上样量两者皆满足条件，才能得到最好的实验结果） d) P3 中和过程的重要性：中和状态，应该是稀松，有质地较轻漂浮到液面顶端，大肠杆菌中的蛋白质、破裂的细胞膜和变性的染色体会相互缠绕成大型复合物，离子交换过程，复合物会从溶液中有有效地沉淀下来，有效去除基因组 DNA，并提高得率，离心除去沉淀后，就可以从上清中回收复性的质粒 DNA。过多菌量并不一定能带来更多的质粒 DNA，反而会造成提取过程当中不必要的麻烦，例如堵柱子，导致得率较低。	
质粒得率低或没有			

RNA残留多，
内毒素超标。

- a) 过多的细胞数量会导致 RNA 残留过多，使得 RNaseA 的酶达到极值，不能消化掉更多的 RNA。RNA 残留过多影响核酸浓度值，使浓度纯度数据不准确。解决办法为降低菌液量，严格按照标注的 OD 值进行操作，或调高 RNaseA 的浓度（杂菌过多 RNA 含量高）。
- b) 不同的菌种内含 RNA\内毒素基础含量不同，需尝试不同条件提取质粒，例如调高 RNaseA 的浓度，出厂设置的 RNaseA 浓度 100μg/ml，内毒素含量过多可尝试重复使用内毒素去除柱，（注：RNA 残留过多质粒总浓度会虚高，RNA 的有效去除、内毒素去除柱的多次有效使用，会降低质粒总浓度，属正常现象）
- c) 质粒 DNA 质量标准
 - ✧ 电泳点样孔异常亮：质粒中污染了细菌基因组 DNA 多是由于 P2 加入后振荡过于剧烈，导致基因组 DNA 剪切或放置时间过长导致的。
 - ✧ 质粒 DNA 条带下方 500bp 左右有条带或者荧光团的存在，RNA 残留，需调整参与提取的菌液用量，或者调整 RNaseA 的浓度；



- ✧ 电泳条带不完整，弥散。



前两孔为杂菌 DNA 污染，裂解不充分，洗涤液性能衰退。后两孔为正常质粒提取，浓度及纯度达到性能标准，条带完整，无基因组 DNA 和 RNA 污染，无降解。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
RNaseA 溶液	TE1008-1	1ml	4℃
	TE1008-0.6	600μl	
	TE1008-0.3	300μl	
P1	TD4200-1-30	30ml	4℃
	TD4200-1-150	150ml	
P2	TD4200-2-30	30ml	室温
	TD4200-2-150	150ml	
P3	TD4200-3-50-N	50ml	室温
	TD4200-3-150-N	150ml	
质粒 DNA 洗涤液 1	TD4200-9-22	22ml	室温
	TD4200-9-55	55ml	
质粒 DNA 洗涤液 2（未加乙醇）	TD4200-10-6	6ml	室温
	TD4200-10-23	23ml	
质粒 DNA 洗脱液	TD4200-7-5	5ml	室温
	TD4200-7-30	30ml	
	TD4200-7-60	60ml	
6 号纯化柱+50ml 漏斗	TC1018-2-N	2 个	室温
	TC1018-10-N	10 个	
	TC1018-20-N	20 个	
注射器内芯	TC1037-2	2 个	室温
	TC1037-5	5 个	
注射器外套(含滤网)	TC1092-2	2 个	室温
	TC1092-5	5 个	
50ml 螺旋盖尖底离心管	JS-CT-109-4	2 个	室温
	JS-CT-109-20	20 个	
	JS-CT-109-40	40 个	