

质粒DNA超快速中量提取试剂盒

(使用说明书 Ver.0.0.1)

产品说明

- ✧ 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，且内毒素含量极低 ($\leq 0.1\text{EU}/\mu\text{g}$)，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：

TD418- 25 (25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	25次	保存
RNase A溶液	2*1ml+600µl	4℃
P1	210ml	4℃
P2	210ml	室温
P3	350ml	室温
质粒DNA洗涤液1	55ml	室温
质粒DNA洗涤液2	23ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	室温
质粒DNA洗脱液	10ml	室温
5 号 PS 纯化柱+15ml 漏斗 X+50ml 漏斗	5个*5	室温
注射器内芯	5个*5	室温
注射器外套(含滤网)	5个*5	室温
2ml收集管	25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的生物实验。

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 $Abs260/280 \geq 1.8$, $Abs260/230 \geq 2.0$ 。
- ✧ 质粒 DNA 产量：每次可提取到约 200~500 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：200-400 μ l。
- ✧ 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

- ✧ 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 μ g/ml）置于4 $^{\circ}$ 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。
- ✧ 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88 ml 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50~80ml过夜培养的菌液，OD值 ≤ 5 ，在 $\geq 5000 \times g$ 离心力下离心5分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
2. 用8ml的溶液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8ml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，不要剧烈震荡，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14ml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，无黏性团状等状态，中和完全后溶液呈现为黄色），在 $\geq 5000 \times g$ 离心力下离心5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5号PS纯化柱（连接15ml和50ml漏斗）连接紧密后放置在负压多连器上，倒入上述第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2ml质粒DNA洗涤液1，打开真空开关，让液体完全通过5号PS纯化柱。
4. 关掉真空开关，加入4ml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5号PS纯化柱。
5. 将5号PS纯化柱套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机上在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
6. 将5号PS纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加200-400 μ l的质粒DNA洗脱液到纯化柱上。（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 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

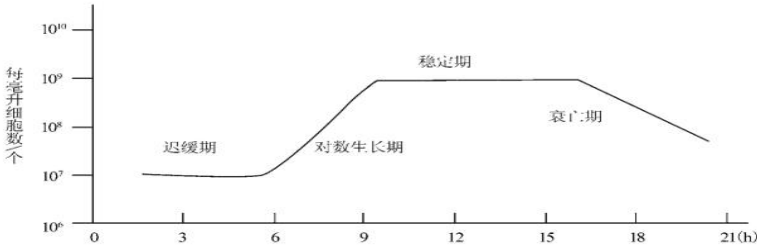
推荐：将洗脱后的质粒DNA重新加回到纯化柱上，进行二次洗脱可以提高产量。如需要浓度较高的质粒DNA推荐添加200 μ l的质粒DNA洗脱液。

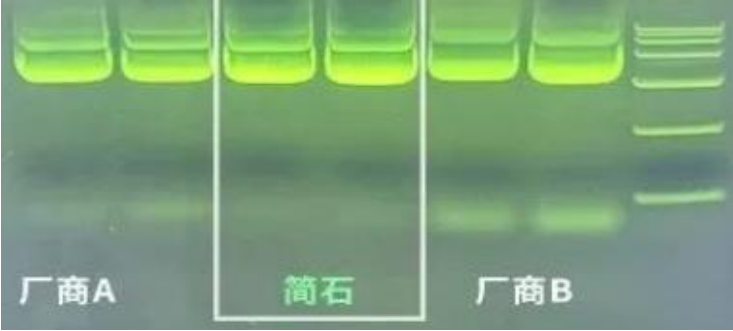
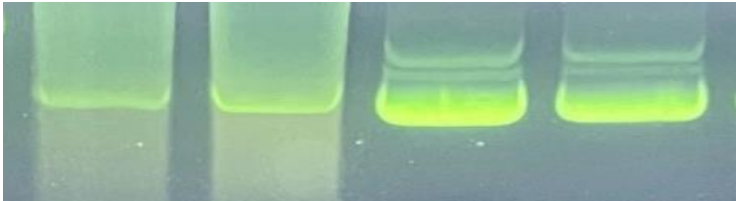
离心操作步骤：

1. 确认5号PS纯化柱（连接15ml漏斗）连接紧密后放置在一个50ml离心管里，倒入上述第5步的混合液，500xg~1000xg 的离心力下离心2分钟，倒掉离心管中的废液，重复此步骤直到混合液全部通过5号PS纯化柱。
2. 加入2ml质粒DNA洗涤液1到5号PS纯化柱内，500xg~1000xg 的离心力下离心2分钟，弃废液。
3. 加入4ml质粒DNA洗涤液2（请先检查是否已加入无水乙醇！），500xg~1000xg 的离心力下离心2分钟，弃掉废液。
4. 去掉15ml漏斗，并将5号PS纯化柱套入到收集管内。然后放置在台式离心机上在 $\geq 10,000 \times g$ 条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
5. 将5号PS纯化柱套在一个干净的1.5ml离心管内，添加200-400 μ l的质粒DNA洗脱液到纯化柱上。（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 $\geq 10,000 \times g$ 条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。

推荐：将洗脱后的质粒DNA重新加回到纯化柱上，进行二次洗脱可以提高产量。如需要浓度较高的质粒DNA推荐添加200 μ l的质粒DNA洗脱液。

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 VIV），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) 挑取单菌落小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℃。  d) 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。 e) 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。 f) 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 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） g) 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
质粒得率低或没有	

	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。
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
RNase A溶液	TE1008-1	1ml	4℃
	TE1008-0.6	600μl	4℃
	TE1008-0.3	300μl	4℃
P1	TD4200-1-150	150ml	4℃
	TD4200-1-210	210ml	4℃
	TD4200-1-410	410ml	4℃
P2	TD4200-2-150	150ml	室温
	TD4200-2-210	210ml	室温
	TD4200-2-410	410ml	室温
P3	TD4200-3-350-N	350ml	室温
质粒DNA洗涤液1	TD4200-9-55	55ml	室温
质粒DNA洗涤液2（未加乙醇）	TD4200-10-23	23ml	室温
质粒DNA洗脱液	TD4200-7-10	10ml	室温
	TD4200-7-20	20ml	室温
	TD4200-7-30	30ml	室温
5号PS纯化柱+15ml漏斗X+50ml漏斗	TC1083-5-N	5个	室温
注射器内芯	TC1037-5	5个	室温
注射器外套(含滤网)	TC1092-5	5个	室温
2ml 收集管	TC1001-25	25个	室温