零内毒素质粒中量提取试剂盒

（使用说明书Ver.1.2.2）

产品说明

- ✧ 独有的显色中和反应，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（≤0.1EU/μg），可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染、细胞实验等多种对纯度要求高的的分子生物学实验。
- ✧ 此产品仅供科研使用。

产品货号：

TD420-2（2次反应） TD420-25（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	2次	25次	保存
RNaseA溶液	300μl	2*1ml+0.6ml	4℃
P1	30ml	210ml	4℃
P2	30ml	210ml	室温
P3	30ml	210ml	室温
质粒DNA结合液	30ml	210ml	室温
质粒DNA洗涤液1	12ml	55ml	室温
质粒DNA洗涤液2（未添加乙醇）	6ml	23ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇		
质粒DNA洗脱液	2ml	10ml	室温
5号PS纯化柱+15ml漏斗X+50ml漏斗	2个	25个	室温
注射器内芯	2个	25个	室温
注射器外套	2个	25个	室温
2号内毒素去除柱	2个	25个	室温
2ml收集管	2个	25个	室温

注意事项

- ✧ 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。
- ✧ 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。
- ✧ 溶液P3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。
- ✧ 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。

- ✧ 菌液OD值在≤5时，进行质粒DNA提取内毒素可低至（≤0.1EU/μg），注：内毒素去除柱为可用步骤，使用后内毒素含量急剧降低，但是伴随浓度明显损失，酌情使用。
- ✧ 纯度极高的质粒DNA可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染等。

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≥1.8，Abs260/230≥2.0，内毒素含量≤0.1EU/μg。
- ✧ 质粒DNA产量：每次可提取到约100μg~300μg，具体取决于质粒拷贝数，细胞数量及培养条件等因素。
- ✧ 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：≥200μl。
- ✧ 操作温度：室温（15-30°C）。
- ✧ 操作时间：20分钟

溶液制备（使用之前需要配制）

- ✧ 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~120μg/ml）置于2-8℃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。
- ✧ 使用前，试用装的质粒DNA洗涤液2请按照瓶体标注体积添加无水乙醇；需向23 mL质粒DNA洗涤液2中加入88 mL无水乙醇，混匀后使用。

操作步骤:

1. 取50ml过夜培养的菌液，在≥3400xg离心力下离心10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4-7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！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8ml预冷过的溶液P3，温和地上下翻转4-7次，直到中和完全后，会出现黄色絮状沉淀。（中和物应蓬松均匀，无黏性团状等状态，中和完全后溶液完全呈现为黄色），在≥3400xg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，然后把注射器下端的接头拧开并将上一步混合物慢慢倒入注射器内，将注射器推杆推入，收集过滤液（大约会收集到20ml左右的过滤液）。
6. 然后在过滤液中加入8ml质粒DNA结合液，盖上盖子颠倒10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ZYMORESEARCH公司）

负压操作步骤：

1. 确认5号柱PS（连接15ml和50ml漏斗）连接紧密后放置在负压多连器上，倒入第6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，倒入2ml质粒DNA洗涤液1，打开真空开关，让液体完全通过5号柱PS。
4. 关掉真空开关，加入2ml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号柱PS。
5. 重复第4步。
6. 将5号柱PS套在2ml收集管上，然后放置在台式离心机上在≥10,000xg条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
7. 将5号柱PS套在干净的1.5ml离心管内，添加200-400μl的质粒DNA洗脱液到纯化柱基质上。缓慢添加，充分浸润纯化柱基质（洗脱液事先在65-70℃水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在≥10,000xg条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。测定质粒DNA浓度。

推荐：将洗脱后的质粒DNA重新加回到纯化柱基质上，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200μl的质粒DNA洗脱液。

以下为可选步骤，内毒素去除柱为选用，使用后内毒素含量极具降低，但是伴随浓度明显损失，酌情使用。

8. 将内毒素去除柱套在一个干净的1.5ml离心管内。将上一步洗脱下来的质粒DNA全部加到去除柱内,室温下放置2分钟，在5,000xg的离心力下离心1分钟洗脱无内毒素的质粒DNA。

离心操作步骤：

1. 确认5号柱PS（连接15ml漏斗）连接紧密后放置在一个50ml离心管里，倒入第6步的混合液，500xg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号柱PS。
2. 加入2ml质粒DNA洗涤液1到5号柱PS内，500xg离心力下离心2分钟，弃掉废液。
3. 加入2ml质粒DNA洗涤液2到5号柱PS内（请先检查是否已加入无水乙醇！），500xg离心力下离心2分钟，弃掉废液。
4. 重复第3步。
5. 去掉15ml漏斗，并将5号柱PS套入到收集管内。然后放置在台式离心机上在≥10,000xg条件下空转2分钟以去除残留乙醇。
6. 将5号柱PS套在干净的1.5ml离心管内，添加200-400μl的质粒DNA洗脱液到纯化柱基质上。缓慢添加，充分浸润纯化柱基质（洗脱液事先在65-70℃水浴中预热，洗脱效果更好），室温放置2分钟，在≥10,000xg条件下离心1分钟来洗脱质粒DNA。测定质粒DNA浓度。

推荐：将洗脱后的质粒DNA重新加回到纯化柱基质上，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200μl的质粒DNA洗脱液。

以下为可选步骤，内毒素去除柱为选用，使用后内毒素含量极具降低，但是伴随浓度明显损失，酌情使用。

7. 将内毒素去除柱套在一个干净的1.5ml离心管内。将上一步洗脱下来的质粒DNA全部加到去除柱内,室温下放置2分钟，在5,000xg的离心力下离心1分钟洗脱无内毒素的质粒DNA。

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℃
	TD4200-1-210	210ml	
P2	TD4200-2-30	30ml	室温
	TD4200-2-210	210ml	
P3	TD4200-3-30	30ml	室温
	TD4200-3-210	210ml	
质粒DNA结合液	TD4200-4-30	30ml	室温
	TD4200-4-210	210ml	
质粒DNA洗涤液1	TD4200-5-12	12ml	室温
	TD4200-5-55	55ml	
质粒DNA洗涤液2（未添加乙醇）	TD4200-6-6	6ml	室温
	TD4200-6-23	23ml	
质粒DNA洗脱液	TD4200-7-10	10ml	室温
	TD4200-7-2	2ml	
5号PS纯化柱+15ml漏斗X+50ml漏斗	TC1083-2	2个	室温
	TC1083-5	25个	
注射器内芯	TC1037-2	2个	室温
	TC1037-5	25个	
注射器外套	TC1092-2	2个	室温
	TC1092-5	25个	
2号内毒素去除柱	TC1060-2	2个	室温
	TC1060-25	25个	
2ml收集管	TC1001-2	2个	室温
	TC1001-25	25个	