

无内毒素质粒大量提取试剂盒

目录号

PE717-10

产品组成

组分	规格 (10 rxns)
RNase A (10 mg/mL)	1.0 mL
Buffer BL	25 mL
Buffer I	100 mL
Buffer II	100 mL
Buffer III	100 mL
Endotoxin Removal Buffer	60 mL
Buffer W1 (concentrate)	60 mL
Buffer EB	30 mL
吸附柱 EC (with Collection Tubes)	10 个
Collection Tubes	10 个

保存条件

常温 (10~25°C) 保存 12 个月, 加入 RNase A 后的 Buffer I 置于 2~8°C 保存 6 个月。

产品简介

本试剂盒采用改良的碱裂解处理方法及硅胶膜吸附技术, 可特异、高效地获得无内毒素高纯度质粒 DNA; 柱上直接去除内毒素, 操作简便。所得质粒可直接用于细胞转染、酶切、连接、转化、PCR、测序等分子生物学实验。高拷贝质粒, 100 mL 菌液通常可获得 500~1500 ug 质粒, 低拷贝质粒, 200 mL 菌液通常可获得 200~600 ug 质粒。从简便性、得率及纯度综合评价, 本试剂盒优于市面上常见品牌。

产品特点

本产品仅供科研使用

- 操作简便：柱上快速去除内毒素，其他步骤亦简便高效；
- 纯度高：沉淀致密，去杂干净；
- 颜色指示：关键步骤颜色变化指示判断。

适用范围

本品适用于从 100 mL~200 mL 细菌培养物中提取多至 1500 ug 的高纯度无内毒素的质粒 DNA。

注意事项

1. 细菌培养时间一般为 12~16 h，如接种量大则应减少培养时间，过度培养会降低质粒质量甚至导致突变；
2. 每次使用时需观察 Buffer II 和 Buffer III 是否形成沉淀，如有沉淀于 37°C 溶解后使用；
3. 用平衡液处理过的柱子建议立即使用，放置时间过长影响使用效果；
4. 第一次使用前，按照瓶上标签向 Buffer W1 中加入 180 mL 无水乙醇；
5. Buffer I 加入 RNase A 后置于 2~8°C 保存；
6. 各溶液使用后请立即盖紧盖子；
7. 所有操作均在室温下进行；
8. 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、质粒的稳定性等因素有关。

使用方法

自备：无水乙醇、异丙醇、50 mL 离心管。

1. 柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 2.5 mL 的平衡液 Buffer BL（当天处理），10,000 rpm 离心 2 min，弃去收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中；
2. 取 100~200 mL（对于高拷贝质粒，建议 100 mL 菌液；对于低拷贝质粒，建议 200 mL 菌液，最高不超过 300 mL 菌液）过夜培养的菌液，10,000 rpm 离心 2 min，弃上清；
3. 加入 10 mL Buffer I（**使用前将试剂盒提供的 RNase A 全部加入**），旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀，呈现出均匀混浊的棕红色；

注意：确保菌体沉淀悬浮均匀，含未悬浮菌块会影响裂解，导致提取质粒的浓度及纯度降低。

4. 加入 10 mL Buffer II，温和颠倒混匀使菌体完全裂解，直至溶液变成清亮、粘稠的紫红色；

注意：不可剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 的污染；所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，可增加 Buffer II 的用量，在后续的操作中按倍数增加 Buffer III 的用量。

5. 加入 10 mL Buffer III，立即温和颠倒混匀，可见红黄相间的絮状物产生，继续混匀直至完全变为黄色。10,000 rpm 离心 10 min，小心将上清转移至干净离心管（自备）中（**不要带入沉淀**）；

本产品仅供科研使用

注意:

- 1) Buffer III 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀, 如果上清中还有紫色漂浮物, 说明复性不充分, 继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色;
 - 2) 离心后在最上层可能会形成一层致密的漂浮膜, 注意不要倒入吸附柱;
 - 3) 如果实验室采用吊篮式离心机, 不是固定转子, 转速达不到 10000 rpm, 可以采用吊篮离心的最大转速 4250 g, 离心 10 min.
6. 加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇, 颠倒混匀 (加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染);
7. 将步骤 6 所得混合溶液转移到平衡好的吸附柱 EC (with Collection Tubes)中, 10,000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中的滤液 (吸附柱最大容积为 15 mL, 即上步中所得溶液需分 2~3 次过柱);

注意: 如果离心机转子倾角较大时, 建议加入吸附柱的溶液体积不超 10 mL, 以防漏液。

8. 向吸附柱 EC 中加入 5 mL Endotoxin Removal Buffer, 静置 5 min, 10,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;
9. 加入 10 mL Buffer W1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 10,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;
10. 加入 5 mL Buffer W1, 10,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;
11. 将吸附柱 EC 放回空收集管中, 10,000 rpm 离心 5 min;
12. 将吸附柱 EC 置于新的 50 mL 离心管中, 开盖放置 5 min, 彻底挥发乙醇;
13. 在吸附膜的中间部位加入 1~2 mL 洗脱液 Buffer EB (60~65°C 预热效果更好), 常温放置 2 min, 10,000 rpm 离心 2 min, 即得质粒 DNA (如需较多量 DNA, 可将得到的溶液重新转入吸附柱, 重复此步骤)。

常见问题与解决办法

Q1: 质粒 DNA 产量低?

A1:

- 1) 质粒拷贝数低、质粒 > 10 kb 或革兰氏阳性菌质粒。应加大菌体使用量, 可使用 300~500 mL 过夜培养物, 洗脱液 Buffer EB 60°C 水浴预热, 吸附和洗脱时间可以适当延长, 以增加提取效率;
- 2) 菌种问题。菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 培养细菌前建议先划线活化, 以稳定产量;
- 3) 细菌未充分裂解。细菌须在 Buffer I/RNase A 中充分重悬或菌体不宜过多, 避免成团或过量的细菌无法裂解降低产量。

Q2: 质粒 DNA 中有基因组 DNA 污染?

A2:

- 1) 菌液培养时间太长。菌液培养时间需控制在 12~16 h;
- 2) 裂解问题。加入 Buffer II 时, 必须轻柔颠倒混匀; 处理多个样品时, 从加入 Buffer II 时算起, 总时间不要超过 5 min。

本产品仅供科研使用