

无内毒素超纯质粒大提试剂盒

说明书修订日期: 2021.01.26

Cat number: KGA2110

Store at RT for one year

For Research Use Only

一、产品及特点

本产品使用独特的硅胶膜吸附技术,可与质粒DNA高效并专一地结合。同时使用独特的溶液P3和过滤器,可有效去除内毒素、蛋白等杂质;整个提取过程仅需1h,操作简便快速。使用本试剂盒提取的质粒DNA适用于各种常规操作,如酶切、PCR、测序、连接、转化和转染等多种实验。

二、规格及成分

成份	10T
Buffer BL	30 ml
Buffer P1	100 ml
Buffer P2	100 ml
Buffer P3	100 ml
RNase A 溶液 (100 mg/mL)	500 μ l
大提离心吸附柱CP6	10 个
收集管 (50 ml)	20 个
漂洗液PW	70 ml
洗脱缓冲液TB	30 ml
过滤器CS1	10 个

三、运输及保存

- 1.该试剂盒可在室温干燥下保存1年,更长时间保存可放于2-8 (若出现沉淀,可在室温放置一段时间或者37 水浴10min至沉淀溶解,此为正常析出现象);
- 2.第一次使用前将RNase A (全部)加入Buffer P1中,混匀后2-8 保存,可稳定保存12个月以上,单独包装的RNase A在室温下可稳定保存12个月以上。

四、使用前准备

- 1.高拷贝质粒推荐使用量为100 ml,得率在500-1500 μ g左右,低拷贝质粒推荐使用量为200 ml,得率在200-600 μ g左右。
- 2.注意不要直接接触Buffer P2和Buffer P3,使用后应立即盖紧盖子;
- 3.使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出,避免滤膜因压力而松动;
- 4.使用前先在PW中加入无水乙醇,加入体积参照瓶上标签。

五、使用方法

- 1、柱平衡:向吸附柱CP6中(吸附柱放入50ml收集管中)加入2.5ml Buffer BL,8000rpm离心2min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中,立即使用不可存放时间过久,如隔天等。

- 2、取100ml（根据菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用200 ml）过夜培养的菌液加入离心管，室温8000rpm离心3min，收集细菌，尽量吸除上清液，为确保上清液全部吸取，可用干净的吸水纸吸取瓶壁上的水滴。
- 3、向留有菌体沉淀的离心管中加入8ml Buffer P1（含有RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮沉淀，混匀。
- 4、向离心管中加入Buffer P2 8ml，立即温和地上下翻转6-8次，使菌体充分裂解，室温放置5min。（避免剧烈振荡，此时菌液应为清亮粘稠状，如不清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量）
- 5、离心管中加入8ml Buffer P3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀，室温放置10min左右。8000rpm离心5-10min，使白色沉淀离心至管底（如未完全沉淀可适当增加离心时间）。将全部溶液小心倒入过滤器CS1中（避免倒入大量沉淀），慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的50ml离心管中。
- 6、向滤液加入0.3倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀后转移到吸附柱CP6中（吸附柱放入50ml收集管中）。
- 7、室温8000rpm离心2min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP6重新放回收集管中。
- 8、向CP6中加入10ml漂洗液PW（加入乙醇的），8000rpm离心2min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱CP6重新放回收集管中。
- 9、重复步骤8。
- 10、CP6中加入3ml无水乙醇，室温8000rpm离心2min，倒掉废液。
- 11、将CP6重新放回收集管中，室温8000rpm离心5min，目的是将吸附柱中的残余漂洗液去除。
- 12、将CP6置于一个干净的50ml收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加1-2ml洗脱液TB，室温放置5min，室温8000rpm离心2min。将50ml离心管中的洗脱液全部转移至一个干净的1.5ml离心管中，-20保存。

六、注意事项

- 1、提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。若所提质粒为低拷贝质粒或大于10kb的大质粒，应增加菌体使用量，同时按比例增加Buffer P1、P2、P3的用量；洗脱缓冲液推荐在65-70℃水浴中预热。可以适当延长吸附和洗脱时间，提高提取效率。
- 2、得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度，OD₂₆₀值为1相当于大约50μg/ml双链DNA。纯质粒DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀通常在1.8-2.0左右，可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对DNA纯度要求高的实验中。
- 3、（步骤2）菌液较多时可通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌液量以能够充分裂解为佳，菌液过多会导致裂解不充分从而降低质粒的提取效率。
- 4、（步骤6）过滤后滤液会有损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱CP6的最大容积为15ml，所以需要分两次过柱，个别情况下离心机转子倾角较大，此时，建议加入吸附柱CP6的溶液体积不超过10ml，防止产生漏液现象。
- 5、漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等），为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱CP6开盖，置于室温放置数分钟，彻底晾干残余漂洗液。
- 6、为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤12。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用ddH₂O做洗脱液应保证其pH值在7.5-8.0范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率，洗脱液用量的多少主要根据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定，洗脱液体积不少于1ml，体积过小影响回收效率。