

超纯质粒大提试剂盒

说明书修订日期: 2017.02.27

Cat Number: KGA1910

Store at RT for 12 months (RNase A -20°C)

For Research Use Only (科研专用)

一、 试剂盒说明

1. 该试剂盒采用常规的碱裂解法裂解细胞, 经沉淀, 离心除去基因组 DNA、蛋白质和 RNA, 经吸附柱选择性地吸附 DNA, 再通过简单的洗涤步骤除去非特异性结合的杂质, 洗脱得到纯度较高的质粒, 可直接用于转化、DNA 测序、PCR、基于 PCR 的突变、体外转录、酶切等后续实验。本试剂盒具有以下特点:
2. 操作过程快速、方便。整个抽提过程可以在 60 分钟左右完成。
3. 无需使用酚/氯仿抽提, 无需乙醇沉淀。
4. 抽提得到的质粒纯度高。

二、 试剂盒组份

组分	10T	20T
纯化套件(吸附柱+2个收集管)	10套	20套
Buffer P1	110 ml	2×110 ml
Buffer P2	110 ml	2×110 ml
Buffer P3	2×75 ml	4×75 ml
Buffer DW1	55 ml	110 ml
Wash Solution	24 ml	2×24 ml
Elution Buffer	30 ml	60 ml
RNase A	1.6 ml	2×1.6ml
VisualLyse	0.5 ml	1ml

三、 准备工作

1. 自备试剂: 无水乙醇等。
2. 试剂盒初次开启, 将 RNase A 全部加入至 Buffer P1 中, 混匀后在瓶身做好标记, 储存于 2-8°C, 有效期为 6 个月。
3. Buffer P2 和 Buffer P3 在低温下可能产生沉淀, 使用前请检查, 如有沉淀, 请于 37°C 溶解, 带冷却至室温后使用。
4. 按瓶身标签说明 Wash Solution 中加入 4 倍提及的无水乙醇, 混匀后在瓶身做好标记, 于室温密封保存。每次试用后将瓶盖盖紧, 以保持 Wash Solution 中的乙醇含量。若 Wash Solution 由于运输或保管不当造成容量不准, 请用量筒定容后再加入相应体积的无水乙醇。
5. 提前将水浴锅调至 60°C 备用。

四、 操作步骤

1. 在含合适抗生素的培养基中接种目标菌株, 于 37°C 摇床充分振荡培养 12-16h。
✓ 菌液状态对质粒得率非常关键, 请用不超过容器容量 1/4 体积的培养基进行培养。

- ✓ 处于生长平台期的菌体用于质粒抽提得率最高，过度培养可能导致 DNA 降解。
- 2. 对于高拷贝质粒，取 75ml-175ml 菌液，10,000rpm 离心 3min，收集菌体，倒尽或吸干培养基。
 - ✓ 菌液用量与菌液浓度密切相关，建议最大菌液用量不要超过 500/OD₆₀₀ml。
 - ✓ 对于低拷贝数的质粒，请用 150-350ml 细胞，同时按比例相应提高 Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer P3 的用量。
 - ✓ 如果使用更多的菌液，则同一个样品分多管收集，分别裂解，合并同一个样品的各管裂解液通过同一个吸附柱来获得更高的得率。
- 3. 在菌体沉淀中加入 10ml Buffer P1，吸打或震荡至彻底悬浮菌体。
 - ✓ Buffer P1 首次使用时请检查是否已加入 RNase A。
 - ✓ 一定要彻底悬浮菌体，否则影响的率和质量。
 - ✓ 如果使用 VisualLyse，则在加入 10ml P1 后再加入 40ul VisualLyse，振荡混匀。
 - ✓ VisualLyse 需在临用前加入，直接加入到 Buffer P1 中出现浑浊为正常现象。
- 4. 加入 10ml Buffer P2，立即温和颠倒离心管 5-10 次混匀，室温静置 2-4min。
 - ✓ 裂解时间与菌量相关，菌量多则适当延长时间，最长不能超过 5 分钟。
 - ✓ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法，计时从第一管样品加入开始。
 - ✓ 以溶液由浑浊变澄清且粘稠，为裂解完全的标志。
- 5. 加入 14ml Buffer P3，立即上下颠倒 5-10 次，室温放置 5min。
 - ✓ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法。加入 Buffer P3 后，离心管中会立即出现大量白色絮状沉淀。
 - ✓ 如果起始菌液较多，混匀后室温静置 2min 以彻底去除 RNA。
- 6. (Optional) 90℃水浴 8min，取出后-20℃放置 10min，继续步骤 7。
 - ✓ 此步骤可以充分去除杂蛋白，确保杂蛋白在离心时完全沉淀。
- 7. 12,000rpm 离心 15min。
 - ✓ 离心后溶液应为澄清的，如果还混有微小悬浮物可再次离心，或延长离心时间，待完全沉淀后再取上清。
- 8. 将上清全部小心移入吸附柱，室温放置 5min，8,000rpm 离心 2min。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
 - ✓ 如果裂解液较多，可以重复该步骤直至所有裂解液流过吸附柱。
 - ✓ 不要吸取到沉淀，否则会出现基因组 DNA 和蛋白质污染。
 - ✓ 如果上清中有沉淀浮起，可以将一片滤纸折叠成漏斗型装在吸附柱上，对倒入的上清进行过滤。
- 9. (Optional) 向吸附柱中加入 5ml Buffer DW1，8,000rpm 离心 2 分钟。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
- 10. 向吸附柱中加入 5ml Wash Solution，8,000rpm 离心 2 分钟。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
 - ✓ Wash Solution 首次使用时请检查是否已加入正确量的无水乙醇。
- 11. 重复步骤 10 一次。
- 12. 将空吸附柱和收集管放入离心机，10,000rpm 离心 2min。
 - ✓ 此步绝不可省略，否则残余的乙醇会严重影响得率和后续实验。
 - ✓ 可将离心后的吸附柱放入恒温箱中 50℃干燥 5 分钟，或自然晾干 10 分钟。有助于乙醇挥发完全。
- 13. 将吸附柱放入干净的 50ml 离心管中，在吸附膜中央加入 2ml Elution Buffer，室温静置 2 分钟，10,000rpm 离心 2 分钟。将所得到的质粒 DNA 溶液置于-20℃保存或用于后续试验。
 - ✓ Elution Buffer 为 2.5mM Tris-HCl, pH 8.5，可以用 TE 或水 (pH>7.0) 代替。
 - ✓ 将 Elution Buffer 预热至 60℃可以进一步提高得率。
 - ✓ 请勿使用小于 1ml 的洗脱液进行洗脱。

五、注意事项

Buffer P3 中含有刺激性的化合物，操作过程中应穿上实验服，戴好乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，防止吸入口鼻。沾染皮肤或眼睛后，请立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。

