

质粒大量提取试剂盒说明书

RM0221

保存条件

按照产品内容指示温度存放各成份，储存 18 个月不影响使用效果。

产品信息

| 产品名称 | 产品货号 | 规格 |
|-----------|--------|------|
| 质粒大量提取试剂盒 | RM0221 | 20 次 |

产品简介

本试剂盒用碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA，采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂，只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质，获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD_{260/280} 通常在 1.8 左右，得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在 Eppendorf 管中操作，方法简单，不需特殊设备，无需过柱，不用酚氯仿抽提；基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒，不必担心质粒 DNA 的丢失。本方法提取纯化质粒 DNA，对质粒损伤小，即使是 10kb 甚至 100kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒，只要碱裂解法能够提取，就可以有效纯化。

产品内容

| 组成 | 保存 | RM0221 |
|------------------|-------|--------|
| RNaseA (10mg/ml) | -20°C | 1.3mL |
| 溶液 P1 | 室温 | 130mL |
| 溶液 P2 | 室温 | 100mL |
| 溶液 PIII | 室温 | 100mL |
| 杂质清除剂 A | 室温 | 3mL |
| 杂质清除剂 B | 室温 | 30mL |
| 内毒素清除剂 | -20°C | 10mL |
| DNA 溶解液 | 室温 | 10mL |

产品特点

- 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速、方便、从 100-140 ml 大肠杆菌 LB 培养液中，可快速提取 0.2-0.5mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90 %。

- 获得的质粒产量高，超螺旋比例高，纯度好，可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。
- 内毒素含量极低 (<0.1 EU/μg DNA)，可直接应用于细胞转染。

使用方法

(自备试剂: 异丙醇、70%乙醇 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中, 混匀, 使用后置于 2-8°C 保存。)

1. 取过夜培养菌 <140ml 菌液, 装入合适的离心瓶中, 4,500~6,000xg 于 4°C 离心 10 min 沉淀菌体, 完全弃除上清。
2. 加入 5ml 溶液 P1, 充分混悬震荡菌体沉淀, 使其完全分散开, 至无絮块存在。细菌悬液移入 50ml 离心管中, 室温放置 3~5 min。
3. 加入 5ml 溶液 P2, 轻轻颠倒离心管 6~8 次, 室温放置 5 min, 使细菌完全裂解, 溶液透明。
4. 加 5ml 溶液 PIII, 立即颠倒离心管 6~8 次, 充分混匀, 至白色絮状物产生。冰上放置 5-10min。上述裂解液于 4°C 12,000~16,000xg 离心 15 min, 小心吸出上清, 移入新的 50ml 离心管中。
6. 加入 10ml 异丙醇, 颠倒离心管, 充分混匀(可选: 室温放置 10 min)。
7. 于 4°C 12,000~16,000xg 离心 10 min, 小心弃去上清, 倒置轻轻沥干残余液体, 加入 3-5ml 70%乙醇漂洗一遍, 最高速离心 5 min, 弃上清, 晾干沉淀。
8. 加入 1.4ml 溶液 P1 完全溶解沉淀团块(可用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解)。移入新的 1.5ml 离心管中, 60°C 水浴放置 10~20 min。
9. 最高速离心 2 min, 取上清转入 2 个新的 1.5ml 离心管中(每个 700μl)。每管加入 55μl 杂质清除液 A, 颠倒充分混匀。
10. 加入约 0.1 体积(约 80μl)冰预冷的内毒素清除剂, 颠倒旋转 7-10 次(30 秒左右)充分混匀, 冰浴或者冰上放置 ≥10 min, 中间偶尔颠倒混匀几次。内毒素清除剂加入上清后, 上清会变得浑浊, 但是冰浴后应恢复清亮。
11. 37°C 水浴, 溶液又会变为浑浊, 颠倒混匀后 37°C 温育 5 min。
12. 室温 16,000xg 离心 5-10 min 分相(温度低时, 内毒素清除剂无法分相, 因此必须至少 20°C 以上室温离心)。
13. 溶液必须分为上下两相, 否则应重复步骤 10-11。上层水相含 DNA, 下层油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管(注意不要吸到

油状层), 弃油状层。

14. 可选步骤: 根据对内毒素指标的要求重复抽提 1-2 次, 即重复步骤 9-12 一两次, 该步骤可以提高纯度, 但是会损失一定量的质粒 DNA, 请根据具体需要选择使用。

15. 将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除液 B (约 750 μ l), 轻柔混匀后冰上放置 10~30 min, 4 $^{\circ}$ C 16,000xg 离心 10 min, 弃上清(注意不要丢失 DNA), 轻轻加入 1ml 70%乙醇洗涤, 离心弃上清, 室温倒置晾干 5~10 min 使乙醇完全挥发。

16. 加适量 DNA 溶解液 (200~500 μ l) 溶解沉淀 (可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中振荡以辅助溶解)。要注意很多质粒 DNA 可能附着在离心管侧壁上, 即使看不见, 也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒 DNA。

注意事项

1. 第一次使用时, 将试剂盒所带全部的 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, 提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留, 在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

2. 内毒素清除剂在 4 $^{\circ}$ C 可保存一个月, 如果要长期保存, 建议保存在 -20 $^{\circ}$ C。

3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀, 可在 37 $^{\circ}$ C 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。

4. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒, 应加大菌体使用量, 同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量。

5. 提取大质粒时操作动作要轻柔, 应该使用剪大了开口的吸头, 防止机械剪切对 DNA 的损坏。

6. DNA 沉淀液沉淀离心后, 可能看不到明显沉淀。如未见沉淀, 担心 DNA 丢失, 可保留上清液, 待完成全部操作后电泳鉴定, 以确定是否获得终产物 (数百微克 DNA 离心沉淀在管的侧壁上, 可能无法看到明显团块)。

7. 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 50 μ g/ml DNA。电泳可能为单一条带, 也可能为 2 条或者多条 DNA 条带, 这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成,

与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 95%。