

无内毒素质粒大量提取试剂盒

目录号

GS70170-10

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 (15~30°C) 保存 15 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 200~600ug 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 12~16h，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）；

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。