快速无内毒素质粒 DNA 中量试剂盒（负压法）说明书

产品组成

快速无内毒素质粒 DNA 中量试剂盒（负压法）	25 次制备
Cat. No.	1023025
去内毒素过滤器	25 套
纯化柱延长管	25 个
连接管	25 个
核酸纯化柱	25 个
2 ml 收集管	25 个
RNase A	260 μl
Buffer I	130 ml
Buffer II	130 ml
Buffer N3	130 ml
Buffer W2（浓缩液）	15 ml
Buffer E	15 ml
说明书	1 份

产品储存与有效期

1. RNase A 可室温运输，收到后请置于 2~8℃储存。加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8℃储存，储存时间若超过 6 个月，需重新补加 RNase A。
2. 其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本试剂盒采用碱裂解法抽提质粒及核酸柱纯化技术开发而成，搭配去内毒素过滤器，可有效去除内毒素、蛋白等杂质，适合于从 20～100 ml 细菌培养物（LB 培养基）中提取多至 200 μg 的高纯度质粒 DNA，适用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、转化、真核细胞转染、基因治疗、DNA 疫苗等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇、异丙醇
2. 50 ml 离心管、1.5 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套、纸巾及防护用品
4. 可使用 50 ml 离心管及 1.5 ml 离心管的离心机
5. 负压装置（Simgen Cat. No. A-100）、旋涡振荡器

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 向装有 RNase A 的螺旋盖管中加入 1 ml Buffer I，混匀后再将溶液吸回到装有 Buffer I 的瓶子中，并在标签的方框中打勾做好“RNase A 已加”的标记，置于 2~8℃保存。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer W2 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
4. 当室温低于 15℃时，使用 Buffer II 前应先观察试剂是否有白色沉淀产生，若有沉淀则应于 37℃温育直至沉淀完全溶解，颠倒混匀后再使用。

操作步骤

1. **用 50 ml 离心管离心收集 20~100 ml 过夜培养的细菌培养物（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），弃培养基，将离心管倒置于纸巾上 1 分钟，去尽残留培养基。**
   * 菌液过多时，可通过多次离心将细菌收集到同一个 50 ml 离心管中。
2. **加入 5 ml 已加入 RNase A 的 Buffer I，悬浮细菌沉淀。**
   * 可用旋涡振荡器振荡或用移液器多次吸打的方法悬浮沉淀的细菌块。充分悬浮的细菌呈均一的悬浊液，不应留有可见的小菌块，否则将严重影响最后质粒的产量。
3. **加入 5 ml Buffer II，盖紧管盖，温和并充分地上下翻转 6-8 次混合均匀，使菌体充分裂解。**
   * 使用 Buffer II 前确认溶液中没有可见沉淀存在；Buffer II 使用完后应盖紧瓶盖，避免与空气长期接触。
   * 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
   * 当细菌裂解充分时，溶液应呈黏稠的半透明状；如果达不到上述效果，可能因细菌用量过多所致，可增加翻转的次数以达到细菌充分裂解的效果。注意此步骤不应超过 5 分钟。
4. **加入 5 ml Buffer N3，盖紧管盖，温和地翻转离心管直至溶液中残留的蓝色沉淀全部转变为淡黄色沉淀，≥4,500 rpm 离心 5 分钟。**
   * 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
5. **将去内毒素过滤器放入一个洁净的 50 ml 离心管中，抽出活塞（请缓慢抽出活塞，以免底部滤片松动影响内毒素去除效果），将步骤 4 中的离心上清液全部倒入去内毒素过滤器中，插入并轻轻推动活塞，使滤液全部滴入 50 ml 离心管中。**
   * 倒入去内毒素过滤器中的上清液混有部分黄色沉淀不影响过滤效果。
   * 去内毒素过滤器能去除 90%的内毒素，能满足绝大多数转染实验的需求。针对一些敏感细胞的转染，需要去除 99%的内毒素时，可单独购买内毒素清除剂（Simgen Cat. No. 1050020/1050100）处理提取好的质粒 DNA。
6. **向滤液中加入 5 ml 异丙醇，盖紧管盖，温和地上下翻转 10 次混合均匀。**
7. **将连接管插入负压装置的负压孔，再在连接管上插入核酸纯化柱，最后在核酸纯化柱上插入纯化柱延长管（详见负压装置说明书）。将步骤 6 中的混合液倒入纯化柱延长管中，开启负压，使液体全部滤过核酸纯化柱。暂停负压，取下并丢弃纯化柱延长管。**
   * 为了避免交叉污染，请不要将连接管重复使用。
   * 为了避免交叉污染，请不要将核酸纯化柱直接插入负压装置的负压孔。
8. **加 800 µl Buffer W2 到核酸纯化柱中，开启负压吸尽核酸纯化柱中的液体。**
   * 确认在 Buffer W2 中已经加入无水乙醇。
9. **重复步骤 8 一次。**
10. **关闭负压，待负压消失后取下并丢弃连接管，将核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中，盖上管盖，最高速（≥12000 rpm）离心 1 分钟。**
    * 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的质粒中残留有乙醇而影响后续的实验效果。
11. **弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 100~200 µl Buffer E，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**
    * 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。
    * 也可用去离子水洗脱 DNA，但应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。
    * 如果测得的质粒 DNA 浓度大于 500 ng/µl，推荐进行二次洗脱以提高质粒 DNA 的回收效率：将洗脱过的核酸纯化柱置于另一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在核酸纯化柱的膜中央再次加入 60~100 µl Buffer E，盖上管盖，室温静置 2 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。
12. **弃核酸纯化柱，洗脱的质粒 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将质粒 DNA 储存于－20℃备用。**