

无内毒素质粒 DNA 大量试剂盒说明书

产品组成

| | | |
|------------------|------------|------------------|
| 无内毒素质粒 DNA 大量试剂盒 | 2 次样品 | 25 次制备 |
| Cat. No. | 1017002 | 1017025 |
| 去内毒素过滤器 | 2 套 | 25 套 |
| 核酸纯化柱 | 2 套 | 25 套 |
| RNase A | 56 μ l | 520 μ l |
| Buffer I | 28 ml | 260 ml |
| Buffer II | 28 ml | 260 ml |
| Buffer N3 | 15 ml | 130 ml |
| Buffer ETR | 15 ml | 130 ml |
| Buffer W2 (浓缩液) | 15 ml | 80 ml \times 2 |
| Buffer E | 10 ml | 90 ml |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 |

产品储存

1. RNase A、Buffer ETR 可室温运输，收到后请置于 2~8°C 储存。加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8°C 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°C），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，适合于从 120~250 ml 细菌培养物（LB 培养基）中提取多至 1.5 mg（1.5 mg 是纯化柱的饱和吸附值，实际提取量由细菌用量及质粒的拷贝数决定）的质粒 DNA，去内毒素过滤器和去内毒素溶液的配合使用，确保提取到的质粒 DNA 内毒素含量极低，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、2 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 2 ml 离心管的离心机
5. 旋涡振荡器、冰水浴、水浴锅、恒温培养箱
6. 可能需要 3 M 乙酸钠（pH 5.2）、70%乙醇

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 30°C。
2. 将水浴锅设置到 42°C，将恒温培养箱设置到 37°C。
3. 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°C 保存。
4. 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。
5. 当室温低于 15°C 时，使用 Buffer II 前应先观察试剂是否有白色沉淀产生，如有沉淀则应于 37°C 温育直至沉淀完全溶解，颠倒混匀后再使用。

操作步骤：

1. 用自备的 50 ml 离心管离心收集 150~250 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。
2. 加入 10 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 10 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，溶液应呈粘稠的半透明状；如果达不到上述效果，可能因细菌用量过多所至，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， $\geq 4,500$ 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（自备）中，抽出活塞，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，若提取的质粒 DNA 是用于强壮细胞的转染，可直接进入步骤 9 操作。
6. 在滤液中加入 5 ml Buffer ETR，盖紧管盖，颠倒混匀，冰浴 10-15 分钟。冰浴期间每隔 3~5 分钟旋涡振荡数秒，使滤液变为澄清透亮状。
7. 42°C 水浴 5 分钟，使滤液变为浑浊状， $\geq 4,500$ rpm 离心 5 分钟。
 - * 若离心结束取出离心管时发现有黄色小液滴悬浮在上清中，可能是离心机停止转动时的波动带起的，静置 1 分钟左右即可。
 - * 离心机温度必须设置在 30°C ，如果发现不能有效分相，可再次离心 10 分钟。
8. 将上清液转移到一个洁净的 50 ml 离心管（自备）中，不要吸取底部含有内毒素的黄色沉淀。
9. 在收集的上清液中加入 14 ml 异丙醇，盖紧管盖，温和地上下翻转 10 次混合均匀。取 20 ml 混合液加入核酸纯化柱中，盖上管盖， $\geq 4,500$ rpm 离心 2 分钟。
10. 弃离心管中滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中，将剩余混合液全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖， $\geq 4,500$ rpm 离心 2 分钟。
11. 弃离心管中滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中。向核酸纯化柱中加入 10 ml Buffer W2，盖上管盖， $\geq 4,500$ rpm 离心 2 分钟。
 - * 确认已按试剂瓶上的指定体积在 Buffer W2 中加入无水乙醇。
12. 重复步骤 11 一次。
13. 弃离心管中滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中， $\geq 4,500$ rpm 离心 15 分钟。
 - * 如果离心机的最高速可达 10,000 rpm 以上，可将离心条件更改为 $\geq 10,000$ rpm 离心 5 分钟。
14. 弃 50 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 50 ml 离心管（自备）中，开盖，恒温培养箱中 37°C 静置 10-15 分钟。
 - * 此步骤是为了去除纯化柱上残留的乙醇，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。
15. 在纯化柱的膜中央加入 2 ml Buffer E，开盖，室温静置 5 分钟，最高速离心 5 分钟。
 - * 如果离心速度不能超过 5000 rpm，可能仅能获得 1.2~1.5 ml 的质粒 DNA，此时可按步骤 16 进行二次洗脱以提高质粒 DNA 的回收效率。
 - * 也可用去离子水洗脱质粒 DNA，但是应确保水的 pH 值在 7.0-8.5，否则将影响质粒 DNA 的洗脱效率。
16. 如果测得的质粒 DNA 浓度大于 200 ng/ μl ，推荐进行二次洗脱以提高质粒 DNA 的回收效率：将洗脱过质粒 DNA 的核酸纯化柱置于另一个洁净的 50 ml 离心管（自备）中，在纯化柱的膜中央加入 1 ml Buffer E，开盖，室温静置 5 分钟，最高速离心 5 分钟。
17. 弃纯化柱，合并两次洗脱的质粒 DNA 储存于 -20°C 备用；或按以下步骤进行浓缩。

质粒 DNA 浓缩步骤：

1. 将质粒 DNA 分装到 2~3 个 2 ml 离心管中，在每个离心管中加入 0.1 个 DNA 溶液体积的 3 M 乙酸钠（pH 5.2）和 0.8 个 DNA 溶液体积的异丙醇，混合均匀，13000 rpm 离心 10 分钟。
2. 弃尽上清，保留管底 DNA 沉淀。每管加入 1.5 ml 70% 乙醇，旋涡振荡悬浮沉淀，13000 rpm 离心 5 分钟。
 - * 注意勿丢弃管底的 DNA 沉淀。
3. 弃尽上清，将离心管放回离心机简短离心，用 200 μl 移液器吸弃管底的残留液体（切勿吸取得到沉淀），开盖，在超净台上室温干燥 DNA 沉淀 10 分钟。
4. 每管加 100 μl Buffer E 或去离子纯水，旋涡振荡以充分溶解质粒 DNA 沉淀，将质粒 DNA 储存于 -20°C 备用。
 - * 如果质粒 DNA 的拷贝数较低，可减少加入的 Buffer E 的体积以增加质粒 DNA 的浓度。