

去内毒素质粒小量提取试剂盒

V02

货号：D1140

规格：50T/100T

保存：室温保存，有效期 1 年。（附件：RNase A（FJD1140），收到未使用前请-20℃保存；内毒素清除试剂常温保存，开盖使用后请于 2-8℃保存）。

产品组成：

试剂盒组成	D1140-50T	D1140-100T	保存
RNase A	100μL	100μL×2	-20℃
内毒素清除试剂	20mL	40mL	RT
溶液 P1	10mL	20mL	RT
溶液 P2	10mL	20mL	RT
溶液 P3	10mL	20mL	RT
漂洗液	15mL	15mL×2	RT
洗脱液	15mL	30mL	RT
吸附柱（含收集管）	50 套	50 套×2	RT
说明书	1 份	1 份	-

产品说明：

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，根据离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA 的原理特异性提取质粒 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。Solarbio 公司研制的内毒素清除剂，可最大限度地除去内毒素。从 1-5mL 大肠杆菌 LB 培养液中，可快速提取 5-15μg 高纯度质粒 DNA，提取率达 85-90%。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 纯度高，可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。

使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签（每瓶需单独加入 45mL 无水乙醇）。P1 在使用前先加入 RNase A（将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入），混匀，置于 2-8℃保存。如非指明，所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

第一次开盖使用后，请将内毒素清除试剂于 2-8℃保存，可以缩短使用时的冰上预冷时间。

操作步骤（仅供参考）：

1. 取 1-5mL 细菌培养物，12000rpm 离心 1min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 200μL P1（请先检查是否已加入 RNase A），使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意：如菌块未彻底混匀，会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。
3. 向离心管中加入 200μL P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意：混匀一定要温和，以免污染细菌基因组 DNA，此时菌液应变得清亮粘稠，作用时间不要超过 5min，以免质粒被破坏。
4. 向离心管中加入 200μL P3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。12000rpm 离心 10min，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，尽量不要吸出沉淀。注意：P3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
5. 加入上清 1/5 体积的冰上预冷内毒素清除剂，振荡混匀溶液变浑浊，冰浴 5-10min 至溶液变清亮。
6. 42℃水浴 5min，不时振荡，溶液又变浑浊，12000rpm 室温离心 5min，溶液应分为两相，上层水相含质粒 DNA，下层油相含内毒素。
7. 将含质粒 DNA 的上层水相转移至新管，弃下层油相，注意不要吸入油状相。重复抽提三次，即重复步骤





5-7 三次。

8. 加入 0.4 倍上清体积的无水乙醇，充分混匀后加入吸附柱中(吸附柱加入收集管中)，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

10. 向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

11. 12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温或 50°C 温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验，如酶切、PCR 等。

12. 将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50-200 μ L 经 65°C 水浴预热的洗脱液，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

13. 为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

注意事项：

1. 使用前请先检查 P2 和 P3 是否出现混浊，如有混浊现象，可在 37°C 水浴中加热几分钟，待溶液恢复澄清后再使用。P2、P3、漂洗液使用后应立即拧紧盖子。

2. 洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ L，体积过小影响回收效率；洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率，DNA 产物应保存在 -20°C，以防 DNA 降解。

3. 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，使用 5-10mL 过夜培养物，同时按照比例增加 P1、P2 和 P3 的用量，吸附和洗脱时可以适当的延长一段时间，以增加提取效率。

4. DNA 浓度及纯度检测：得到的质粒 DNA 纯度与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的 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。DNA 应在 OD₂₆₀ 处有显著吸收峰，OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μ g/mL 双链 DNA、40 μ g/mL 单链 DNA。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响吸光值，但并不表示纯度低。

相关产品：

D1010 6 \times DNA Loading Buffer

T1060 50 \times TAE 缓冲液

T1050 5 \times TBE 缓冲液

M1070 D2000 plus DNA Ladder

M1400 1kb DNA Ladder

G8142 GoldView II 型核酸染色剂(5000 \times)

相关文献：

- [1] Deguang Wu, Xuewu Guo, Jun Lu, et al. A rapid and efficient one-step site-directed deletion, insertion, and substitution mutagenesis protocol. *Analytical Biochemistry*. March 2013;254-258. (IF 2.275)
- [2] Jian Dong, Guanglu Wang, Cuiying Zhang, et al. A two-step integration method for seamless gene deletion in baker's yeast. *Analytical Biochemistry*. August 2013;30-36. (IF 2.275)
- [3] Haigang Tan, Jian Dong, Guanglu Wang, et al. Enhanced freeze tolerance of baker's yeast by overexpressed trehalose-6-phosphate synthase gene (TPS1) and deleted trehalase genes in frozen dough. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. August 2014;41. (IF 2.533)

注：更多使用本产品的文献请参考索莱宝官网。

