

无内毒素质粒小提中量试剂盒

货号： SB-213 50 次

适用范围：适用于 5-15ml 中等规模质粒制备 (mid preparations)

试剂盒组成	保存	50 次
RNaseA	4°C	5mg
溶液 P1	室温	30ml
溶液 P2	室温	30ml
溶液 N3	室温	15 ml
溶液 N4	室温	70 ml
去蛋白液 PE	室温	30ml
漂洗液 WB	室温	20 ml
		第一次使用前按说明加入 80ml 无水乙醇 (即 4 倍体积)
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

储存事项:

- 第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后置于 2-8°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37°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。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品介绍:

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，通过独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素，然后离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低 (<0.1 EU/μg DNA)，细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

注意事项:

- 所有的离心步骤均在室温完成。
- 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒，过夜培养 14-16 个小时，5-15ml 培养物可提取出 15-70μg 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应当适当加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、N3 的用量，其它步骤相同。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

提示: 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定量无水乙醇, 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!

将 RNase A 全部加入溶液 P1 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8°C 保存。

1. 取 5-15 ml 毫升过夜培养的菌液, 10,000rpm 离心 1-2 分钟, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。
2. 用 500 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至彻底悬浮, 全部转入一个 2ml 离心管。如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。
3. 加 500 μ l 的溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解, 室温放置 4 分钟。温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免基因组 DNA 剪切断裂! 所用时间不应超过 5 分钟! 以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠, 如果菌体少, 很快清亮粘稠后就可以做下一步, 不是一定要准确的 5 分钟。
4. 加 250 μ l 溶液 N3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀时会出现白色絮状沉淀。12,000rpm 离心 10 分钟, 小心取上清至新管, 避免吸取到漂浮白色沉淀。
5. 转移 0.95ml 上清液至 2.0ml 离心管, 加入等体积 N4, 颠倒旋转混匀,
6. 将 5 步所得溶液分步加入吸附柱 AC 中 (柱子最大体积 750 μ l), 13000rpm 离心 30s
7. 弃滤液, 把柱子放入收集管, 加入 500 μ l 漂洗液 PE .12000rpm 离心 30s
8. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。再加入 600 μ l 漂洗液 WB, 重复漂洗一次。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 80-100 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 离心 1 分钟。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 50 μ l, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量