无内毒素质粒大提试剂盒（转染级）

目录号：SB-NG223　　10 次

试剂盒组成	保存	10 次
RNaseA	4°c	60mg
溶液 P1	室温	120ml
溶液 P2	室温	120ml
溶液 N3	室温	60ml
内毒素清除剂	室温	25 ml
平衡液	室温	30ml
漂洗液 PE	室温	60ml
漂洗液 WB	室温	50ml 第一次使用前加 4 倍体积无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20ml
注射器（20m）	室温	10
吸附柱 D8	室温	10
50ml 收集管	室温	20

储存条件：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 第一次使用时，将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1**（加入 1ml P1 至 RNaseA 干粉中，吸打 10 次至粉剂完全溶解，然后全部加入 P1 中）**置于 4℃保存，有限期 3-5 个月。
2. 如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃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。
4. 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，粗提物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：

快速，方便，从 150-200 ml 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 0.2-1.5mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90 %。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。本品采用独特的溶液体系可处理各种质粒载体（包括高中低拷贝，大型质粒，如 BCA,cosmid 等）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。

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℃保存。

1. 取 150-200 ml 过夜培养的菌液（16-18 小时），8000rpm，离心 2-3 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。

   收集超过 50 毫升菌液，可以离心弃上清后，在同一个 50ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

2. 加 9 ml 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮，静置 10 分钟。

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 9 ml 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 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。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 加 4.5ml 溶液 N3，立即温和地上下翻转 10-20 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。8000rpm 离心 10-15 分钟，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮白色沉淀。加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

5. 取出过滤器活塞,把第 4 步离心后的上清全部倒入过滤器中，把活塞的出水口对准已准备好的 50ml 离心管（自备）把活塞插入过滤器使裂解液过滤到 50ml 离心管中，

内毒素清除步骤：

1）加入 0.1 倍体积的内毒素清除剂，颠倒混匀，冰浴 10 分钟，

2）42-50°c 水浴 5 分钟，8000rpm 离心 10 分钟

3）小心从离心机里取出样品时，避免下层内毒素结合液再次溶解，把上清全部转移到新的 50ml 离心管中，

6. 加入 1/3 倍体积的异丙醇至上清中，颠倒混匀 6-8 次，静置 2 分钟。

关于平衡液的使用：

介绍：核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力，从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37℃使沉淀完全消失。

使用方法：取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 2.5ml 的平衡液至柱子中。静置 2 分钟，8000rpm 离心 3 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

7. 将第 6 步混合液分次（10-15ml）加入吸附柱 D8 中，直至混合液全部转移到吸附柱里并离心，弃废液。

可选步骤 ：加入 5ml 漂洗液 PE 8000rpm 离心 3 分钟，弃掉废液。此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

8. 将吸附柱 D8 放回空收集管中，加入 10ml 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），8000rpm 离心 3-5 分钟，弃掉废液。再加入 10ml 漂洗液 WB，重复漂洗一次。

9. 将吸附柱 D8 放回空收集管中，最高速（最好大于 8,000rpm）离心 3 分钟以干燥基质膜上残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，打开盖子室温晾干 3-5 分钟。

该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。

10. 取出吸附柱 D8，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中预热可提高产量），室温放置 3 分钟，8,000rpm 离心 3 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， 但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量（最小不应少于 1ml）。

质粒浓缩(低浓度的质粒)

1. 每 1 倍洗脱液，加入 1 倍异丙醇和 0.1 倍的 溶液 N3，颠倒混匀，室温静置 5min，13,000 rpm 离心 10min。
2. 弃上清，加入 1.0ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm 离心 5min。
3. 弃上清，加入 1.0ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm 离心 5min。
4. 弃上清，空气干燥沉淀 5-10min,根据需要体积溶解沉淀。