

质粒提取试剂盒-大量 说明书

组分 \ 编号	ZD-TG-37-10
MaxII 离心柱	5 个/包×2
50ml 离心管	5 个/包×2
溶液 PA	220ml/瓶×1
溶液 PB	220ml/瓶×1
溶液 PC	220ml/瓶×1
RNase A	1.5ml/管×1 (10mg/ml)
溶液 TE	25 ml/瓶×1+12ml/瓶×1
说明书	1 份

存储和稳定性

- RNase A 长期保存应置于-20℃。其它试剂室温避光保存。
- 保质期：12 个月。

产品介绍

重鼎生物是Takegene®无胍盐质粒纯化系统的发明者。基于重鼎生物技术有限公司专利技术Takegene®无胍盐质粒纯化系统有如下的优良特性：

- 高纯度的纯化质粒。无胍盐残留，无离子交换树脂脱落物残留。
- 提高了离心柱对质粒的亲合力使吸附的质粒量大大提高。
操作方便，费时少。

使用前说明

- 首次使用前，阅读说明书，熟悉实验步骤及注意事项。
- 产品一次可提取 1500 μg 质粒。高拷贝质粒推荐菌液用量为 100~200 ml，低拷贝质粒需加大菌液用量。
- 细菌过多或过少时，根据收集细菌体积调整溶液 PA、PB、PC、无水乙醇及 RNaseA 的用量：先估算离心后的细菌沉淀体积，PA 用量为菌沉淀体积的 10~15 倍，溶液 PA、PB、PC 和无水乙醇用量比为 1:1:1:0.5，溶液 PA 中 RNaseA 工作浓度为 50-100μg/ml。
- 离心均室温进行，低温离心不利于去除 RNA。
- 每次使用前观察溶液 PB 是否有沉淀。室温过低溶液 PB 出现沉淀时，40℃~60℃水浴至溶液澄清，摇匀后使用。
- 用户自备仪器、耗材及试剂：台式小型离心机或真空抽滤装置、合适的离心管、无水乙醇、80%乙醇 (v/v)。

操作步骤

1. 取大肠杆菌过夜培养液 100~200 ml，8000×g 离心 5min，弃上清液。
2. 向沉淀中加入 14ml 溶液 PA 及 140μl RNase A，充分混悬细菌（细菌必须成单个混悬状态，否则严重影响得率）。
3. 加入 14ml 溶液 PB，上下颠倒使液体充分混匀，室温放置 2~3min。
注：不可涡旋剧烈震荡，以免基因组 DNA 污染。当液体澄清粘稠时表明细胞已充分裂解即可进行下一步。放置时间不要超过 5min。当放置 5min 时液体仍未澄清表明菌体过多造成裂解不彻底。
4. 加入 14ml 溶液 PC，上下颠倒 5~7 次（一上一下为一次）（如溶液存在发粘拉丝现象说明未充分混匀）。

5. 加入 7 ml 无水乙醇, 颠倒充分混匀。最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5min。
6. 选用步骤“6a”离心法或步骤“6b”抽滤法使液体通过离心柱(质粒即结合于柱上)。抽滤法需自备适合的真空抽滤装置。

6a: 将步骤“5”离心后上清液约 23ml 移入套有收集管的离心柱中, $8000\times g$ 离心 2min, 取出离心柱后弃去收集管中废液, 将离心柱放回收集管。

重复上述操作使上清液全部通过离心柱。至步骤“7”。

6b: 取出收集管中的离心柱, 将柱子下尖端连接至抽滤装置。开启抽气泵, 向离心柱中添加步骤“5”上清液。待液体全部过柱后, 向柱中加入 20ml 80%乙醇。待液体全部过柱后, 向柱中加入 10ml 无水乙醇。待液体全部过柱后, 持续抽气 5~10min (去除残留乙醇)。将离心柱放回原收集管中。至步骤“10”。
7. 向离心柱中加入 80%乙醇(自备) 20 ml, $8000\times g$ 离心 2 min。弃去收集管中废液, 将离心柱放回。
8. 向离心柱中加入无水乙醇(自备) 10 ml, $8000\times g$ 离心 1 min。弃去收集管中废液, 将离心柱放回。
9. 最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5 min。将离心柱从收集管中取出, 放入新的 50ml 离心管中。敞口放置 5~10min (挥发残存乙醇。如有残留乙醇将严重影响质粒洗脱)。
10. 加入 1.5ml 溶液 TE(预热至 50~60°C 时使用可提高洗脱效率), 室温放置 3~5min, 最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5min。质粒溶液即收集在 50ml 离心管中。

注 1): 推荐先用溶液 TE 1ml 洗脱一次, 再用 600 μ l 洗脱一次, 合并

两次洗脱液。

下表为 MaxII 柱用不同体积的溶液 TE 多次洗脱质粒的效率(供参考)。

洗脱顺序	溶液 TE 体积	洗脱效率
第 1/2/3/4 次	2/1.2/2/2ml	74%/14%/8%/4%

注 2) 可选用纯水(自备)进行洗脱。纯水 pH 值不低于 7, 且 DNA 产物应于 -20°C 保存以防降解。

问题	原因	解决办法
得率低	细菌未充分裂解	加入 溶液PA 后充分混悬细菌
	大肠杆菌过度生长或保存不当	大肠杆菌培养勿超过 12-16 小时。将细菌离心沉淀后如不马上纯化保存于 -20°C 。不要放在 4°C 过夜
	低拷贝质粒	使用更多的细菌培养液。 溶液PA、PB、PC 用量加倍
无质粒DNA	抗菌素失效, 大肠杆菌丢失质粒	重新培养
基因组DNA污染	加 溶液PB 后放置时间太久	加 溶液PB 后混合时不要太激烈。放置不要超过 5min
RNA 污染	未加 RNase A	步骤“2”中加入 RNase A
电泳时质粒漂浮出加样孔	离心柱中有乙醇残留	步骤“9”中延长敞口放置时间

宁波市重鼎生物技术有限公司

主页: <http://www.genepure.com>

电话: 4008780133