

无内毒素质粒提取中量

说明书

组分 \ 编号	ZD-TG-38-10	ZD-TG-38-20
中量离心柱	10 个/包×1	10 个/包×2
midi Endo-free 过滤柱	10 个/包×1	10 个/包×2
15ml 离心管	10 个/包×2	10 个/包×4
溶液 PA	30 ml/瓶×1	65 ml/瓶×1
溶液 PB	30 ml/瓶×1	65 ml/瓶×1
溶液 PC	30 ml/瓶×1	65 ml/瓶×1
溶液 RE	25ml/瓶×1	60ml/瓶×1
溶液 CE	20ml/瓶×1	45ml/瓶×1
RNase A	120μl /管×1 (15mg/ml)	240μl /管×1 (15mg/ml)
溶液 TE	25ml/瓶×1	50ml/瓶×1
70% 乙醇	33 ml/瓶×1	66 ml/瓶×1
无内毒素水	6 ml/瓶×1	12ml/瓶×1
说明书	1 份	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

试剂盒基于高性能的固相基质以及专利的去除内毒素技术，高效获取无内毒素质粒 (<0.1EU/μg 质粒 DNA)。在溶液体系的作用下，菌体裂解质粒被释放并吸附于固相基质，洗脱后经内毒素去除步骤后即获得高纯度质粒。提取的质粒 DNA 可适用于各种常规实验操作。

注意事项

- 首次使用前阅读说明书，熟悉实验步骤及注意事项。如有疑问通过说明书底部的联系方式沟通。
- 产品一次可提取 200 μg 无内毒素质粒。高拷贝质粒推荐菌液用量为 10~25ml。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。
- 从步骤“10”开始推荐使用无内毒素枪头和容器移取液体。可在其他供应商处购买无内毒素枪头。玻璃器皿在清洗干净后 250℃烘烤 60min 或 180℃过夜烘烤以除去内毒素。
- 离心均室温进行，低温不利于去除 RNA。

使用前准备

- 用户自备试剂：80%乙醇 (v/v)、无水乙醇、异丙醇。
- **使用溶液 PB 及溶液 RE 前，观察瓶内液体是否浑浊或沉淀（室温过低时会浑浊或出现沉淀）。如有，37℃加热至液体澄清，摇匀后使用。**
- 首次使用前，用无内毒素的量器向 70%乙醇瓶中按标签要求加入无水乙醇，摇匀后标记备用。

提取步骤

(一) 质粒提取

1. 取大肠杆菌过夜培养液(高拷贝质粒)5~25ml, 8000×g 离心 5min。弃上清液, 向沉淀中加入 1.6ml 溶液 PA 及 RNase A 10μl, 充分混悬细胞。
2. 加入 1.6ml 溶液 PB, 上下颠倒使之充分混匀, 室温静置 2~3min。
注: 混匀时不可涡旋剧烈震荡, 以免基因组 DNA 污染。静置时间越短超螺旋 DNA 比例越高。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。
3. 加入 1.6ml 溶液 PC, 上下颠倒使充分混匀。加入 0.8ml 无水乙醇, 混匀。最高转速 (≥8000×g) 离心 5min。
4. 将上清液移入套有收集管的离心柱中(小心操作, 勿吸入絮状物), 8000×g 离心 2min。弃去收集管中废液, 将离心柱放回收集管中。
5. 将 80%乙醇(自备) 5ml 移入离心柱中, 8000×g 离心 2min。取出离心柱后弃去收集管中废液, 将离心柱放回。
6. 将无水乙醇(自备) 5ml 移入离心柱中, 8000×g 离心 2min。取出离心柱后弃去收集管中废液, 将离心柱放回。
7. 最高转速 (≥8000×g) 离心 5min。将离心柱取出并放入新的 15ml 离心管中, 敞口放置 5~10min (挥发残余乙醇)。
8. 加入 2ml 溶液 TE, 静置 2~3min。最高转速 (≥8000×g) 离心 5min。质粒溶液即被洗脱于收集管中。
注: 将溶液 TE 预热至 50~60℃时使用可提高洗脱效率。

(二) 质粒去内毒素

9. 弃去离心柱, 向洗脱液中加入 2ml 溶液 RE (注: 即溶液 RE 添加量与洗脱液的体积相同), 充分颠倒混匀 (注: 混匀时必须覆盖所有管壁, 使溶液 RE 可以接触并结合全部内毒素), 室温放置 5min。
10. 加入溶液 CE 1.35ml (注: 即溶液 CE 添加量为溶液 RE 用量的 0.7 倍), 充分颠倒混匀 (注: 混匀时必须覆盖所有管壁, 使溶液 CE 可以接触并沉淀全部内毒素-RE 复合物)。最高转速 (≥8000×g) 离心 5min。
11. 将上清液全部移入套有收集管的 Endo-free 过滤柱中。最高转速 (≥8000×g) 离心 5min。
12. 小心弃去收集管盖及过滤柱 (弃前确认柱中已无残留液体, 否则再次离心使液体全部滤过)。将全部滤液用无内毒素枪头移入新的 15ml 管中 (小心移取液体, 避免碰到原收集管口可能残留的内毒素沉淀)。向滤液中加入等体积的异丙醇 (或两倍体积的乙醇), 充分混匀后静置 15min。最高转速 (≥8000×g) 离心 10min。弃上清。
13. 加入 70%乙醇 5ml 清洗沉淀。8000×g 离心 5min。弃上清。
14. 重复步骤“13”一次。
15. 敞口放置 5~10min, 待乙醇挥发后用适量无内毒素水溶解质粒沉淀。

宁波市重鼎生物技术有限公司

主页: <http://www.genepure.com>

电话: 4008780133