

去内毒素质粒大量制备试剂盒

(离心柱型-细胞转染级别)

产品编号	规格
K116-S	10 次

【提取得率】

质粒类型	菌液量	得率	质粒
低拷贝	200 ml	200-400 μg	pBR322, pACYC 及其衍生载体 pSC101 及其衍生载体, SuperCos, pWE15
高拷贝	100 ml	500-1500 μg	pTZ, pUC, pBS, pGM-T

【产品简介】

本试剂盒对传统的碱裂解法进行了优化，可以在 50 min 内获得高质量质粒 DNA。优化的裂解液可以使得离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，高效、专一吸附 DNA。以下操作步骤适用于提取 100-200 ml 过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

【试剂盒组分】

Components	10 rxns
Clean Column	10 个
Collection tube	10 个
过滤器	10 个
Solution I	100 ml
Solution II	120 ml
Solution III	180 ml
Solution IV	100 ml
Wash Buffer A	108ml
Wash Buffer B	50ml
Elution Buffer	15ml
RNase A(10mg/ml)	1.0ml

【产品特点】

快速：步骤少，操作简单，仅需 50 min。高效：可提取菌体 85%以上质粒 DNA。

【储存条件】

本试剂盒在室温(15-25℃)干燥条件下，可保存 12 个月；更长时间的保存可置于 2-8℃。2-8℃保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37℃水浴中预热 10 min 以溶解沉淀。收到产品后把 RNase A 保存于-20℃冰箱。加入 RNase A 后的溶液 **Solution I** 应置于 2-8℃保存，可稳定保存 6 个月。

【实验前准备】

- 1、将含有目的质粒的菌种接种于含有相应抗生素的 LB 培养基中，37℃摇床培养 16 小时扩增质粒。
- 2、用酶标仪或者 NanoDrop 检测菌液的浓度 (OD600) 的值介于 1-1.5 之间；
- 3、把全部 RNase A 加入 Solution I 中，于 2-8℃保存；
- 4、加 72ml 无水乙醇至 Wash Buffer A 中；加 200ml 无水乙醇至 Wash Buffer B 中；
- 5、Eultion Buffer 置于 65℃水浴锅中；

【实验步骤】

1. 用 50ml 的离心管收集 100ml 菌液(高拷贝)或 200ml 菌液 (低拷贝)。10000r/min 离心 3min，去培养基上清。
2. 加入 10mL 的 **Solution I** (检查是否加入 **RNase A**)，涡旋震荡直至菌体完全重新悬浮；室温静置 2min；
3. 涡旋震荡 5 秒步骤 2 中的悬浮溶液并加入 10 mL **Solution II**，轻柔反复颠倒均匀 10-12 次；使菌体裂解充分室温静置 2min，至离心管内形成澄清溶液。
4. 立即加入 15mL 的 **Solution III**，并轻柔颠倒混匀 10-20 次，10000r/min 离心 10min；(使用前先检查溶液 **Solution III** 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在 37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清使用。)
5. 取出过滤器活塞，把步骤 4 的上清倒入过滤器中，把过滤器的出水开口对准已准备好的 50ml 离心管，推动活塞将里面的溶液过滤到离心管中。(为了监控 DNA 的得率，取 0.3ml 上清液至新的离心管，加入 90 μ l 的异丙醇混匀，转移至 DNA 结合柱 (质粒小提试剂盒) 进行离心过柱，按照小提试剂盒进行洗涤和洗脱，计算 DNA 的得率。
6. 测量滤液的体积，加入 1/3 倍体积的 **Solution IV** 至溶液中 (约 10ml)，颠倒混匀 6-8 次，高速涡旋混匀 5 秒，并室温静置 5min。
7. 将上步中的混合液分次转移到 **Clean Column** 上，静置 3min 后，10000r/min 离心 3min，弃滤液并重复此操作至混合液全部过完；
8. 加入 15 mL **Wash Buffer A(加入无水乙醇 72 ml)**，10000r/min 离心 3min，弃滤液；
9. 加入 10mL **Wash Buffer B(加入无水乙醇 200 ml)**，10000r/min 离心 3min，

弃滤液，并重复此步骤 1 次；

10. 12000r/min 空离 5min，确保去除多余的乙醇；
11. 将柱子更换到新的 50ml 离心管中；
12. 加入 1.0mL 预热的 **Elution Buffer**，室温放置 5min，12000r/min 离心 3min，收集并把质粒保存于-20℃冰箱。（推荐将 **Elution Buffer** 加热到 65℃，洗脱效果更佳，如核酸量不够可以再加入 0.5ml **Elution Buffer** 进行再次洗脱。）

【注意事项】

- ① 溶液 **Solution I** 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。
- ② 使用前向洗涤液 **Wash Buffer A, B** 中加入指定量无水乙醇。
- ③ 使用前先检查溶液 **Solution II**、**Solution III** 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在 37℃ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
- ④ 注意皮肤不能直接接触溶液 **Solution II**、溶液 **Solution III**，使用后应立即盖紧盖子。
- ⑤ 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加的用 **Solution I**、**Solution II**、**Solution III** 的用量；洗脱缓冲液推荐在 65-70℃ 水浴中预热。（洗脱液的 PH 值对于洗脱效率有很大影响，建议使用洗脱液 **EB** 进行洗脱，也可用 PH 值在 7-8 之间的去离子水进行洗脱。）

【基本信息】

企业名称：广州艾基生物技术有限公司

住所：广州市海珠区国际生物岛螺旋三路三期四栋 505

邮政编码：510530 电话号码：020-89115575 传真号码：020-82514208

电子邮箱：market@igebio.com 公司网址：www.igebio.com

售后服务单位名称：广州艾基生物技术有限公司

服务热线：020-89115575 传真号码：020-89115575

电子邮箱：market@igebio.com

生产地址：广州市海珠区国际生物岛螺旋三路三期四栋 505

【生产许可证编号/生产备案凭证编号】 粤穗械备 20150193

【说明书核准日期及修改日期】 2020 年 7 月 1 版