

高纯度质粒小量提取试剂盒 (Plasmid Minipure Kit)

目录号: ZP102

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP102-1 (50 次)	ZP102-2 (100 次)	ZP102-3 (200 次)
RNaseA (10 mg/ml)	150 μ l	300 μ l	600 μ l
平衡液 ZBL	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 1	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 2	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 4	20 ml	40ml	80ml
去内毒素缓冲液	30 ml	60 ml	120 ml
漂洗液 W2	15 ml	2×15 ml	2×30ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml	30 ml
吸附柱	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

储存条件:

本试剂盒在室温 (15 - 25°C) 干燥条件下, 可保存 1 年; 更长时间的保存可置于 2 - 8°C。2 - 8°C 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37°C 下溶解沉淀。单独包装的 RNase A 在-20°C 可稳定保存 1 年以上。加入 RNase A 后的溶液 1 应置于 2 - 8°C 保存, 可稳定保存半年。

-1-

产品简介:

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞, 再通过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。由于增加了过滤柱, 与普通的提取方法相比, 本试剂盒可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物, 可从1 - 5 ml大肠杆菌LB (Luria-Bertani) 培养液中, 快速提取多至30 μ g高纯度的高拷贝质粒DNA, 提取率达70 - 85 %。

使用本试剂盒提取的质粒DNA可适用于转染多种细胞及各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

注意事项:

- 按 1: 100 的比例向溶液 1 中加入 RNaseA, 混匀, 置于 2 - 8°C 保存。
- 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液 W2 中加入无水乙醇。
- 使用前先检查平衡液、溶液 2 和溶液 4 是否出现浑浊, 如有混浊现象, 可在 37°C 水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清。
- 注意不要直接接触溶液 2 和溶液 4, 使用后应立即盖紧盖子。
- 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心, 速度为 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)。
- 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

-2-

操作步骤：

1. **柱平衡处理：**向吸附柱中加入 250 μ l 平衡液 ZBL, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1min, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱重新放回收集管中。(处理过的柱子尽量在 1 小时内使用, 如果处理时间过长可再次加平衡液 ZBL 处理。)

注：

- 1、此步骤也可在第 5 步并行操作离心, 即提取液加入吸附柱前平衡柱子即可。
- 2、柱平衡可充分激活硅基质膜, 提高得率; 平衡好的吸附柱放置时间超过 1 小时, 效果将有所下降, 建议再次处理后使用, 但不建议处理 2 次以上。

2. **收集菌体：**取 1 - 5 ml 过夜培养的菌液加入离心管中, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 分钟, 尽量吸除上清 (菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

3. **重悬菌体：**向留有菌体沉淀的离心管中加入 200 μ l 溶液 1 (请先检查是否已加入 RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

注意：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。

4. **裂解菌体：**向离心管中加入 200 μ l 溶液 2, 温和地上下翻转 6 - 8 次使菌体充分裂解。

注意：温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过 5 分钟, 以免质粒受到破坏。

5. **沉淀除杂：**向离心管中加入 250 μ l 溶液 4, 立即温和地上下翻转 6 - 8 次, 充分混匀, 此时会出现白色絮状沉淀。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 10 分钟。

注意：溶液 4 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

6. **吸附纯化：**小心地吸取上清溶液至新管中, 向其中加入 200 μ l 异丙醇颠倒混匀, 将混合液转移到吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), (如果过滤柱中有残余的液体说明步骤 4 吸取的上清中杂质过多, 可以延长离心的时间; 如果离心后收集管底部有少量的沉淀, 尽量的吸取上清)。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

7. **去内毒素：**向吸附柱中加入 500 μ l 去内毒素缓冲液, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

8. **漂洗：**向吸附柱中加入 600 μ l 漂洗液 W2 (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。重复此步聚 1 次。

注意：加入漂洗液 W2 后, 如果室温静置 2 分钟, 有助于更好地去除杂质。

9. **空离：**附柱放入收集管中, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 建议将吸附柱开盖, 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

10. **洗脱：**将吸附柱置于一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 - 100 μ l 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。

注意：为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 重复步骤 9。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液, 应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围), pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l, 体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在-20°C, 以防 DNA 降解。

低拷贝或大质粒 (>10 kb) 提取

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, 使用 5 - 10 ml 过夜培养物, 同时按照比例增加溶液 1、2、4 的用量, 洗脱缓冲液 TE 应在 65-70°C 水浴预热, 在吸附和洗脱时可以适当的延长时间, 以增加提取效率。其它步骤相同。