

无内毒素质粒 DNA 中量试剂盒说明书

产品组成

无内毒素质粒 DNA 中量试剂盒	25 次制备
Cat. No.	1016025
中量过滤柱	25 套
核酸纯化柱	25 套
RNase A	260 μ l
Buffer I	130 ml
Buffer II	130 ml
Buffer N3	70 ml
Buffer ETR	70 ml
Buffer W2 (浓缩液)	80 ml \times 2
Buffer E	60 ml
说明书	1 份

产品储存

1. RNase A、Buffer ETR 可室温运输，收到产品后请置于 2~8 $^{\circ}$ C 储存。加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8 $^{\circ}$ C 储存。如果 Buffer I 储存时间超过 6 个月，需重新补加 RNase A。
2. 其他试剂与物品如果储存于常温（0~30 $^{\circ}$ C），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8 $^{\circ}$ C，可延长产品的有效期至两年以上（2~8 $^{\circ}$ C 储存的产品使用前应先使产品恢复到室温后再使用）。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本试剂盒采用碱裂解法抽提质粒及核酸柱纯化技术，适用于从 40~80 ml 细菌培养物（LB 培养基）中提取多至 500 μ g 去内毒素的质粒 DNA，适用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、转化、真核细胞转染、基因治疗、DNA 疫苗等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇、异丙醇
2. 50 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套、纸巾及防护用品
4. 可使用 50 ml 离心管、离心力大于 12000 g 的离心机
5. 旋涡振荡器、水浴锅、恒温培养箱
6. 可能需要 3 M 乙酸钠(pH 5.2)、70%乙醇

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25 $^{\circ}$ C。
2. 准备冰浴和 42 $^{\circ}$ C 水浴。将恒温培养箱设置到 37 $^{\circ}$ C。
3. 向装有 RNase A 的螺旋盖管中加入 1 ml Buffer I，混匀后再将溶液吸回到装有 Buffer I 的瓶子中，并在标签的方框中打勾做好“RNase A 已加”的标记，置于 2~8 $^{\circ}$ C 储存。
4. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer W2 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
5. 当室温低于 15 $^{\circ}$ C 时，使用 Buffer II 前应先观察试剂是否有白色沉淀产生，如有沉淀则应于 37 $^{\circ}$ C 温育直至沉淀溶解后再使用。

操作步骤：

1. 用自备的 50 ml 离心管收集 40~80 ml 过夜培养的细菌培养物（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），将离心管倒置于纸巾上 1 分钟，除尽上清。
2. 加入 5 ml 已加入 RNase A 的 Buffer I 悬浮细菌沉淀。
 - * 可用旋涡振荡器振荡或用移液器多次吸打的方法悬浮沉淀的细菌块。充分悬浮的细菌呈均一的悬浊液，不应留有可见的小菌块，否则将严重影响最后质粒的产量。
3. 加入 5 ml Buffer II，温和并充分地上下翻转 6-8 次混合均匀，使菌体充分裂解。
 - * 使用 Buffer II 前确认溶液中没有可见沉淀存在；Buffer II 使用后应盖紧瓶盖，避免与空气长期接触。
 - * 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
 - * 当细菌裂解充分时，溶液应呈粘稠的半透明状；如果达不到上述效果，可能因细菌用量过多所致，可增加翻转的次数以达到细菌充分裂解的效果。注意此步骤不应超过 5 分钟。
4. 加入 2.5 ml Buffer N3，温和地翻转离心管直至溶液中残留的蓝色沉淀全部转变为淡黄色沉淀，将中和产物全部倒入中量过滤柱中，盖上管盖， $\geq 5,000 \times \text{rpm}$ 离心 2 分钟。
 - * 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
5. 弃过滤柱，在滤液中加入 2.5 ml Buffer ETR，盖紧管盖，颠倒混匀，冰浴 10-15 分钟。冰浴期间颠倒混匀数次使滤液变为澄清透亮状。
6. 42°C 水浴 5 分钟，使滤液变为浑浊状， $\geq 12,000 \times g$ 离心 10 分钟。
 - * 离心机温度必须设置在 25°C 以上，如果发现不能有效分相，可将温度设置到 30°C 离心 15 分钟。
7. 将上清液转移到一个洁净的 50 ml 离心管中，不要吸取底部含有内毒素的黄色沉淀。
8. 在收集的上清液中加入 7 ml 异丙醇，盖紧管盖，温和地上下翻转 10 次混合均匀。将混合液加入核酸纯化柱中，盖上管盖， $\geq 12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
9. 弃离心管中滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中。向核酸纯化柱中加入 10 ml Buffer W2，盖上管盖， $\geq 12,000 \times g$ 离心 1 分钟。
 - * 确认在 Buffer W2 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 弃离心管中滤液，将核酸纯化柱置回到 50 ml 离心管中， $\geq 12,000 \times g$ 离心 5 分钟。
12. 弃 50 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 50 ml 离心管（自备）中，开盖，恒温培养箱中 37°C 静置 10-15 分钟。
 - * 此步骤是为了去除纯化柱上残留的乙醇，如果此步骤结束后，核酸纯化柱中还能闻到乙醇味，可适当延长静置时间。
13. 在纯化柱的膜中央加入 1-2 ml Buffer E，开盖，室温静置 5 分钟， $\geq 12,000 \times g$ 离心 5 分钟。
 - * 也可用去离子水洗脱质粒 DNA，但是应确保水的 pH 值大于 7.0，否则将影响质粒 DNA 的洗脱效率。
14. 如果测得的质粒 DNA 浓度大于 200 ng/ μl ，推荐进行二次洗脱以提高质粒 DNA 的回收效率：将洗脱过质粒 DNA 的核酸纯化柱置于另一个洁净的 50 ml 离心管（自备）中，在纯化柱的膜中央加入 1 ml Buffer E，开盖，室温静置 5 分钟， $\geq 12,000 \times g$ 离心 5 分钟。
15. 弃纯化柱，合并两次洗脱的质粒 DNA 储存于 -20°C 备用；或按以下步骤进行浓缩。

质粒浓缩步骤：

1. 将质粒 DNA 分装到 2 ml 离心管中，在每个离心管中加入 0.1 个 DNA 溶液体积的 3 M 乙酸钠 (pH 5.2) 和 0.8 个 DNA 溶液体积的异丙醇，混合均匀，13000 rpm 离心 10 分钟。
2. 弃尽上清，保留管底 DNA 沉淀。每管加入 1.5 ml 70% 乙醇，旋涡振荡悬浮沉淀，13000 rpm 离心 5 分钟。
 - * 注意勿丢弃管底的 DNA 沉淀。
3. 弃尽上清，将离心管放回离心机简短离心，用 200 μl 移液枪吸弃管底的残留液体，切勿吸取到沉淀，开盖，在超净台上室温干燥 DNA 沉淀 10 分钟。
4. 每管加 100 μl Buffer E 或去离子纯水，旋涡振荡以充分溶解质粒 DNA 沉淀，将质粒 DNA 储存于 -20°C 备用。
 - * 如果质粒 DNA 的拷贝数较低，可减少加入的 Buffer E 的体积以增加质粒 DNA 的浓度。