

无内毒素质粒 DNA 小量试剂盒说明书

产品组成

无内毒素质粒 DNA 小量试剂盒	5 次样品	50 次制备	250 次制备
Cat. No.	1009005	1009050	1009250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 离心管	5 个	50 个	250 个
RNase A	*	28 μ l	140 μ l
Buffer I	1.5 ml	14 ml	70 ml
Buffer II	1.5 ml	14 ml	70 ml
Buffer N3	1 ml	8 ml	40 ml
Buffer ETR	1 ml	8 ml	40 ml
Buffer HB	3.5 ml	32 ml	160 ml
Buffer W2 (浓缩液)	2.4 ml	24 ml	60 ml \times 2
Buffer E	0.6 ml	6 ml	30 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

*5 次样品中的 RNase A 已加入到 Buffer I 中。

产品储存

1. RNase A、Buffer ETR 可常温运输，收到产品后请置于 2~8°C 储存。
2. 加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8°C 储存。如果 Buffer I 储存时间超过 6 个月，需重新补加 RNase A。
3. 其他试剂与物品如果储存于常温（0~30°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°C，可延长产品的有效期至两年以上（2~8°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

本试剂盒采用了碱裂解法抽提质粒及柱纯化核酸的原理开发而成，适合于从 1~5 ml 细菌培养物（LB 培养基）中提取多至 50 μ g 无内毒素的高纯度的质粒 DNA，特别适用于真核细胞转染、体外转录与翻译等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套、纸巾及防护用品
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 旋涡振荡器

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
2. 准备冰浴和 42°C 水浴。
3. 向装有 RNase A 的冻存管中加入 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°C 保存。
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°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°C 水浴直至沉淀溶解后再使用。

操作步骤

1. 12000 rpm 离心 30 秒收集 3~5 ml 过夜培养的细菌, 弃尽培养基。加入 250 μ l 已加入 RNase A 的 Buffer I, 充分悬浮沉淀的细菌。

* 可用旋涡振荡器振荡或用移液器反复吸注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。

2. 加入 250 μ l Buffer II, 温和并充分地翻转离心管 4~6 次。

* 使用 Buffer II 前确认溶液中没有可见沉淀存在; Buffer II 使用完后应盖紧瓶盖, 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, 可能为细菌用量过多所致, 可增加翻转的次数以达到细菌充分裂解的效果。

* 此步骤不应超过 5 分钟。

3. 加入 125 μ l Buffer N3, 温和并充分地翻转离心管直至溶液中残留的蓝色沉淀全部消失, 转变为淡黄色沉淀。

4. 13000 rpm 离心 10 分钟。

5. 将步骤 4 中的上清液转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中, 加入 125 μ l Buffer ETR, 剧烈混合均匀, 冰浴 10 分钟, 使溶液呈透明状。

* Buffer ETR 较为粘稠, 请用 1000 μ l 移液器加入 Buffer ETR。

6. 将 1.5 ml 离心管转到 42°C 水浴 5 分钟, 使溶液呈现浑浊状。

7. 13000 rpm 离心 3 分钟, 内毒素将聚集在离心管底部的淡黄色下相中。

8. 将步骤 7 中的上相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中, 加入 600 μ l Buffer HB, 混合均匀。

9. 吸取 600 μ l 步骤 8 中的混合液加入到核酸纯化柱中(核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中), 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

10. 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 将步骤 8 中剩余的混合液全部加入到核酸纯化柱中, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

11. 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer W2, 盖上管盖, 12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer W2 中已经加入无水乙醇。

12. 重复步骤 11 一次。

13. 弃 2 ml 离心管中的滤液, 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中, 14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm, 则用最高速离心 2 分钟。

* 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇, 请勿省略, 否则可能因所纯化的质粒中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

14. 弃 2 ml 离心管, 将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中, 在纯化柱的膜中央加入 50~100 μ l Buffer E 或无内毒素超纯水, 盖上管盖, 室温静置 1 分钟, 12000 rpm 离心 30 秒。

15. 弃纯化柱, 洗脱的质粒可立即用于各种分子生物学实验; 或者将质粒储存于 -20 °C 备用。