



武汉楚诚生物

武汉楚诚正茂科技工程有限公司

电话（传真）：027-87388389

400 电话：400-6345-876

地址：武汉市华大家园 A04-1-602

网址：<http://www.chuchengkj.com>

无内毒素高纯度质粒大量快速提取试剂盒

目录编号:CC9758

包装单位:10 次

适用范围：适用于大规模质粒制备（max preparations）

试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10 次
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	750ul
溶液 P1	4℃	75ml
溶液 P2	室温	75ml
溶液 PIII	室温	110ml
结合液 PB	室温	120ml
内毒素清除剂	-20℃	50ml
去蛋白液 PD	室温	100ml
漂洗液 WB	室温	25ml × 2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20ml
吸附柱 AC	室温	10 个
收集管 (50ml)	室温	10 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项：

1. 第一次使用时，将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100ug/ml）置于 4℃ 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

2. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。

3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

产品介绍：本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，粗提物通过独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素，然后离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 PH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 PH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。

2. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速，方便，从 100-200ml 大肠杆菌 LB(Luria-Bertani) 培养液中，可快速提取 0.2-0.5mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90%。

3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低 (<10EU/ug DNA)，细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

注意事项：

1. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 12000xg，带 50ml 转头的台式离心机。

2. 结合液 PB 含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

3. 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 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、PIII 的用量，洗脱缓冲液应在 70℃ 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。

4. 得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD260 值为 1 相当于大约 50ug/ml DNA。电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。

5. 质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。

6. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 PH 大于 7.5，PH 过低影响洗脱效率。用水洗脱，质粒应该保存在 -20℃。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, PH8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

7. 无内毒素清除剂清除内毒素后，质粒产量会有损失，根据不同的宿主菌株会损失 10%-30%不等的质粒产量。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：

◇ 第一次使用前请先在 2 瓶漂洗液 WB 瓶中分别加入 100ml 无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

◇ 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃ 保存。

◇ 将 PIII 溶液放在冰上预冷。

1. 取 150-200 毫升过夜培养的菌液，12,000xg (约 10,000rpm)，离心 1-2 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。

收集超过 50 毫升菌液，可以离心弃上清后，在同一个 50ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 11，直到收集到足够的菌体。

2. 用 7ml 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。

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。

3. 加 7ml 的溶液 P2，温和地上下翻转 4-7 次使菌体充分裂解，室温放置 3-5 分钟。

温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！使用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 加 10ml 溶液 PIII，立即温和地上下翻转 4-7 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。室温或者冰上静置 5 分钟，4℃，12,000xg 离心 15 分钟，小心取上清，避免吸收到漂浮白色沉淀。

加入溶液 PIII 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀，如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

5. 可选步骤（一般不需要做）：4℃，12,000xg 再次离心 10 分钟，小心取上清。

6. 加入 0.1 体积冰预冷的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀 7-10 次，冰浴或者冰上放置 5 分钟，中间偶尔颠倒混匀几次。

内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮。

7. 42℃水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后 42℃温育 5 分钟。

8. 室温 15,000xg 离心 10min 分相（温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少 20℃以上室温离心）。

9. 溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤 7-8。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。

10. 将上一步所得上层水相中加入 0.5 体积结合液 PB 后充分涡旋混匀后分多次（每次不超过 15ml）转入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000xg 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。

11. 加入 10ml 去蛋白液 PD，12,000xg 离心 1 分钟，弃掉废液。

12. 加入 10ml 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000xg 离心 1 分钟，弃掉废液。

13. 重复操作步骤 12 一次。

14. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，最高速（最好大于 12,000xg）离心 5 分钟以干燥基质膜上残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，室温或者 37℃烘箱晾干几分钟。

该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。如果洗脱产量低，则必须加做步骤 15。

15. **可选步骤:**选择以下两种方法之一干燥柱子:

- 1) 取下柱子放置于真空容器中，密封真空容器，提供真空 15 分钟；
- 2) 将柱子放置于 65℃真空干燥箱或烘箱中，放置 10 分钟。

16. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1-2ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中预热效果更好），室温放置 2-5 分钟，12,000xg 离心 5 分钟。如果需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 2 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

问题与解决方法

问题	评论与建议
质粒 DNA 产量低	<ul style="list-style-type: none">*忘加抗生素，非质粒转化细胞过度生长-建议: 确保固体、液体培养基中都加入了适当的抗生素*细菌培养时间太长，老化细菌开始裂解-建议: 接种过夜培养的新鲜单菌落于加了合适抗生素的培养基中培养 12-16 个小时*使用了低拷贝数质粒-建议: 建议使用高拷贝数质粒，低拷贝数质粒应该适当加大处理体积*细菌培养时间过短，菌液内细菌浓度过低-建议: 细菌培养到 [A600]吸光值为 2-4 的时候收集菌体*细菌细胞裂解不完全-建议: 使用建议的菌体处理量，不要过量；

	<p>涡旋或者吹打，确保菌体充分重悬于溶液 P1 中，不应该见到未散开的细菌团块；加入裂解液 P2 裂解后，应该是粘稠和透明的</p> <p>*质粒 DNA 产量使用分光光度计定量不准确-建议：分光光度计定量常常偏高，使用琼脂糖电泳/EB 染色定量</p> <p>*洗脱效率不高-建议：请阅读实验步骤 15 和注意事项 6</p>
未提取到质粒 DNA	<p>*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇</p> <p>*质粒洗脱液含有较多乙醇，琼脂糖电泳/EB 染色定量时质粒 DNA 漂出上样孔-建议：确保已经做了步骤 14，将离心吸附柱的乙醇残留去除；或者适当提高上样缓冲液浓度</p>
质粒 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	<p>*忘记做步骤 14，乙醇抑制了酶切反应-建议：做步骤 14，然后在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。加做步骤 15</p> <p>*一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-建议：将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心 1 分钟，小心取上清使用</p>
基因组 DNA 污染	<p>*裂解时基因组被剪切打断了-建议：做步骤 3 时轻柔的通过颠倒混匀，不要涡旋或者剧烈震荡</p>
质粒 DNA 上缺口或者电泳上超螺旋带前出现变性质粒带	<p>*步骤 3 裂解时间过长-建议：裂解时间不要超过 5 分钟</p>
产物中含有 RNA 污染	<p>*第一次做实验时候，忘记将 RNase A 加入 P1 溶液，RNase A 失活或者起始处理量过量-建议：第一次实验前确保将 RNase A 加入了溶液 P1；P1 溶液超过 3 个月的，可加入一些新 RNase A 在溶液 P1；处理量不要过量；菌体重悬于 P1 溶液后可放置几分钟让 RNase A 充分起作用后再进行下一步</p>