

版本号: DP130227

HighPure Maxi Plasmid Kit

高纯度质粒大提试剂盒

(非离心柱型)

目录号: DP116

产品内容

产品组成	DP116 (10 preps)
溶液P1 (Buffer P1)	100 ml
溶液P2 (Buffer P2)	100 ml
溶液P4 (Buffer P4)	100 ml
TIANRed	500 μ l
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	30 ml
RNase A (100 mg/ml)	500 μ l
过滤器CS1 (Filtration CS1)	10个

储存条件

该试剂盒置于室温(15-25 $^{\circ}$ C)干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8 $^{\circ}$ C。2-8 $^{\circ}$ C保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在37 $^{\circ}$ C水浴中预热10 min, 以溶解沉淀。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中, 混匀后置于2-8 $^{\circ}$ C保存, 可稳定保存12个月以上。单独包装的RNase A 在室温可稳定保存12个月以上。

产品简介

本试剂盒采用独特的缓冲系统, 结合传统的异丙醇沉淀方法, 可快速获得大量高纯度的质粒DNA。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、转化和转染多种细胞等实验。

推荐每次菌液使用量: 高拷贝质粒推荐使用量为100 ml, 得率一般在500-1500 μg 左右; 低拷贝质粒推荐使用量为200 ml, 得率一般在200-400 μg 左右。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液P1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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
 2. 使用前先检查溶液P2和P4是否出现结晶或者沉淀, 如有结晶或者沉淀现象, 可在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清。
 3. 自备约60 ml的5 M NaCl溶液。
 4. 注意不要直接接触溶液P2和P4, 使用后应立即盖紧盖子。
 5. 使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出, 避免滤膜因压力而松动。
 6. 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P1、P2、P4的用量; 洗脱缓冲液推荐在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热。
 7. **TIANRed的使用方法:** TIANRed是一种指示剂, 用以指示整个操作的正确性, 对人体无害。TIANRed为可选试剂, 客户根据需求选择是否添加。**如果提取质粒后需要进行转染实验, 不建议客户在实验中加入TIANRed试剂。**使用时按照TIANRed: 溶液P1=1:200进行混合, 彻底颠倒混匀, 混匀后的溶液为澄清的红色。将混匀后的溶液加入到收集好的菌体中彻底混匀, 由于菌体的存在, 混匀后的溶液为浑浊的红色; 添加P2之后彻底混匀后, 溶液的颜色为澄清的紫色, 则说明充分裂解; 再添加溶液P4至彻底混匀后, 溶液为澄清的黄色, 说明中和复性充分。
-

操作步骤

1. 取100 ml (根据培养菌体的浓度选择合适的量, 低拷贝推荐用200 ml) 过夜培养的菌液, 室温10,000 rpm (~11,500×g)离心3 min收集细菌。

注意: 菌液较多时, 可多次离心并将菌体沉淀收集到一个离心管中。

2. 尽量吸除上清, 为确保上清液全部吸取, 请倒置干净的吸水纸上。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入10 ml溶液P1(请先检查是否已加入RNase A), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

注意: 请务必彻底混悬, 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。TIANRed试剂的加入对于后续PCR、酶切和测序都没有影响。使用时按照TIANRed: 溶液P1=1:200进行混合, 彻底颠倒混匀, 混匀后的溶液为澄清的红色。将混匀后的溶液加入到收集好的菌体中彻底混匀, 由于菌体的存在, 混匀后的溶液为浑浊的红色。如果提取质粒后需要进行转染实验, 不建议客户在实验中加入TIANRed试剂。

4. 向离心管中加入10 ml溶液P2, 立即温和地上下翻转6-8次, 使菌体充分裂解, 室温放置5 min。

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, 如果未变得清亮, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。

如果使用了TIANRed, 添加P2之后彻底混匀后, 溶液的颜色为澄清的紫色。如果在紫色中混杂有浑浊的红色, 则说明裂解不充分, 继续混匀直至溶液颜色完全变为澄清的紫色。

5. 向离心管中加入10 ml溶液P4, 立即温和地上下翻转6-8次, 充分混匀, 至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置10 min左右。10,000 rpm (~11,500×g)离心5-10 min, 使白色沉淀离至管底 (可适当增加离心时间), 将全部溶液小心倒入过滤器CS1中 (请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器), 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在干净的50 ml的管中 (客户自备)。

注意: 加入溶液P4后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤器CS1中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多 (>100 ml), 推荐延长离心时间至20-30 min。

如果使用了TIANRed, 添加溶液P4之彻底混匀后, 溶液为澄清的黄色, 如果在黄色中混有紫色, 则说明复性不充分, 继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。

6. 向滤液中加入0.35倍滤液体积的异丙醇和1/2倍异丙醇体积的5M NaCl，上下颠倒充分混匀。

注意：若此处无沉淀出现为正常现象。

7. 4°C 10,000 rpm (~11,500×g)离心30 min，轻轻倒掉上清液，将其倒置在吸水纸上。
8. 向管中加入6 ml 70%乙醇充分漂洗沉淀，4°C 10,000 rpm (~11,500×g)离心10 min，轻轻倒掉上清液，将其倒置在吸水纸上。
9. 重复操作步骤8。
10. 将离心管敞口室温放置10-20 min，使乙醇充分挥发后加入1-1.5 ml 洗脱缓冲液TB，充分溶解沉淀。

注意：洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用ddH₂O做洗脱液应保证其pH值在7.5-8.0范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量的多少主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定。洗脱缓冲液体积不少于1 ml，体积过小影响回收效率。DNA产物应保存在-20°C，以防DNA降解。

质粒DNA浓度及纯度检测

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。电泳可能为多条带，这些条带是质粒的多聚体造成的，不影响后续的酶切、转染等实验。OD₂₆₀值为1相当于大约50 µg/ml 双链DNA。

纯化的质粒DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀通常在1.8-2.0左右，可直接应用于分子生物学等常规操作。如果溶解时不使用缓冲液，而使用ddH₂O，比值会偏低，但并不表示纯度低，因为pH值和离子存在会影响光吸收值。
