

无内毒素质粒小提试剂盒

货号： NG203S 50 次
 NG203M 100 次

试剂盒组成	保存	50 次	100 次
平衡液	室温	5ml	10ml
RNaseA	-20°C	150µl	300ul
溶液 P1	4°C	15ml	30ml
溶液 P2	室温	15ml	30ml
溶液 N3	室温	15ml	30ml
内毒素清除剂	-20°C	5ml	10ml
漂洗液 WB	室温	15 ml	25ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml	15ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

储存事项:

第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 2-8°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37°C 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。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，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特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低 (<0.1 EU/µg 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、等实验。

关于平衡液的使用 (可选步骤)

1. 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37°C 使沉淀完全消失。
2. 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100µl 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。接后续的操作步骤。

操作步骤: 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定量无水乙醇，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°C 保存。

1. 取 1.5-4.5 ml 过夜培养的菌液，12,000rpm 离心 30 秒，尽可能的倒干上清，收集菌体。
收集超过 1.5ml 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
2. 用 250µl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。如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 250µl 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4 分钟。温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 分钟，以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。
4. 加 250µl 溶液 N3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。13,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮白色沉淀。加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. 加入 0.1 体积(上清的体积的 10%，约 80µl)的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀，冰浴或者插入碎冰中(或冰箱冷冻室)放置 5 分钟直到浑浊变清亮透明(或仍旧稍有浑浊)，中间偶尔混匀几次。
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(或稍浑浊)。
6. 常温放置 3-5 分钟，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42°C 水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
7. 室温 14,000 x g 离心 10 分钟分相。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。

(可选步骤) 平衡液预处理吸附柱: 使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

8. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇(约 370µl)后充分颠倒混匀后分两次(每次不超过 700µl)转入吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中)，12,000 x g 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
9. 加入 600µl 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。再加入 600µl 漂洗液 WB，重复漂洗一次。
10. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 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 50-100µl 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好)，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 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，室温放置 2 分钟，离心 1 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，但是最小体积不应少于 30µl，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。