天净沙系列

CAT#:260933

低温运输和保存

天净沙

去内毒素质粒大量提取试剂盒

Endotoxin-free Plasmid Maxi Extraction Kit

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是去内毒素质粒大量提取试剂盒，采用碱裂解法裂解细胞，根据离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA 的原理特异性提取质粒 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。本产品特点如下:

1. 可最大限度地除去内毒素。
2. 从50-100 mL大肠杆菌LB培养液中，可快速提取150-250 g高纯度质粒DNA。
3. 提取率达 85-90%。
4. 提取的质粒 DNA 纯度高，可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。
5. 本产品仅能用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成分	编号	规格	包装
去内毒素质粒溶液 1	260933a	40 mL	60 mL 本色瓶
去内毒素质粒溶液 2	260933b	40 mL	60 mL 本色瓶
去内毒素质粒溶液 3	260933c	40 mL	60 mL 本色瓶
去内毒素质粒结合液	260933d	120 mL	120 mL 本色瓶
去内毒素质粒洗涤液	260933e	20 mL×2	120 mL 本色瓶
去内毒素质粒洗脱液	260933f	20 mL	30 mL 本色瓶
RNase A	260933g	600 μL	1.0 μL 本色瓶
内毒素清除剂	260933h	100 mL	120 mL 本色瓶
硅胶膜 DNA 大提离心吸附柱	220351	10 T	自封袋
收集管	260933k	10 T	自封袋
使用手册	260933sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，RNase A 放-20℃保存，内毒素清除剂 2-8℃保存，其他常温保存；有效期 1 年。

自备物品

样本等。

使用流程

一、试剂准备

1. 使用前请先在去内毒素质粒洗涤液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签(每瓶需单独加入 60 mL 无水乙醇)。
2. 将 RNase A 全部加入到去内毒素质粒溶液 1 中，混匀，置于 2-8℃保存。

3. 内毒素清除剂开盖后于 2-8℃保存，可以缩短使用时的冰上预冷时间。

4. 无特别要求则所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

二、操作步骤（仅供参考）

5. 取 50-100 mL 细菌培养物，11000 ×g 离心 1 min，尽量吸除上清(菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

6. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 4 mL 去内毒素质粒溶液 1 (已加入 RNase A)，使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意:如菌块未彻底混匀，会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。

7. 向离心管中加入 4 mL 去内毒素质粒溶液 2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意:混匀一定要温和，以免污染细菌基因组DNA，此时菌液应变得清亮粘稠，作用时间不要超过 5 min，以免质粒被破坏。

8. 向离心管中加入 4 mL 去内毒素质粒溶液 3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。11000 ×g 离心 10 min，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，尽量不要吸出沉淀。

   注意:去内毒素质粒溶液 3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

9. 加入上清 1/5 体积的冰上预冷内毒素清除剂，振荡混匀溶液变浑浊，冰浴 5-10 min 至溶液变清亮。

10. 37℃水浴 5 min，不时振荡，溶液又变浑独，11000 ×g 室温离心 5 min，溶液应分为两相，上层水相含质粒 DNA，下层油相含内毒素。

11. 将含质粒 DNA 的上层水相转移至新管，弃下层油相，注意不要吸入油状相。重复抽提三次，即重复步骤 9-11 三次。

12. 加入 12 mL 去内毒素质粒结合液，充分混匀后加入吸附柱（吸附柱加入收集管中），室温放置 2 min，11000 ×g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

13. 向吸附柱中加入 7 mL 去内毒素质粒洗涤液（已加入无水乙醇），11000 ×g 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

14. 向吸附柱中加入 7 mL 去内毒素质粒洗涤液，11000 ×g 离心 2 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

15. 11000 ×g 离心 2 min，将吸附柱敞口置于室温或 50℃温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的去内毒素质粒洗涤液去除，否则洗涤液中的乙醇会影响后续的实验，

	如酶切、PCR 等。 16. 将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 1-2 mL 经 65℃水浴预热的去内毒素质粒洗脱液，室温放置 2 min，11000 ×g 离心 2 min。 17. 为增加质粒的回收效率，可将去内毒素质粒洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 2 min，11000 ×g 离心 2 min. **三、注意事项：** 18. 使用前请先检查去内毒素质粒溶液 2 和去内毒素质粒溶液 3 是否出现混浊，如有混浊现象，可在 37℃水浴中加热几分钟，待溶液恢复澄清后再使用。去内毒素质粒溶液 2、去内毒素质粒溶液 3、去内毒素质粒洗涤液使用后应立即拧紧盖子。 19. 洗脱缓冲液体积不应少于 500 μL，体积过小影响回收效率；去内毒素质粒洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率，DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。 20. 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，使用 100-200 mL 过夜培养物，同时按照比例增加去内毒素质粒溶液 1、2 和 3 的用量，吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率。 21. DNA 浓度及纯度检测：得到的质粒 DNA 纯度与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的 DNA 可用琼脂糖疑胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50 μg/mL 双链 DNA、40 μg/mL 单链 DNA。OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响吸光值，但并不表示纯度低。
关联产品	真菌 DNA 提取试剂盒（过柱法）