

## 去内毒素质粒小量提取试剂盒

产品货号: BA2001

产品规格: 50T/100T

### 产品介绍:

本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。

乐业公司研制的内毒素清除剂,可最大限度地除去内毒素。从1-5mL大肠杆菌LB培养液中,可快速提取5-15 $\mu$ g高纯度质粒DNA,提取率达85-90%。使用本试剂盒提取的质粒DNA纯度高,可直接用于细胞转染等要求较高的实验,以及其他各种常规操作,包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。

### 产品组成:

组份	50T	100T	保存条件
RNase A	300 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
内毒素清除剂	20mL	40mL	2-8 $^{\circ}$ C
溶液 P1	10mL	20mL	室温
溶液 P2	10mL	20mL	室温
溶液 P3	10mL	20mL	室温
溶液 P4	30mL	60mL	室温
漂洗液	15mL	15mL $\times$ 2	室温
洗脱液	15mL	30mL	室温
吸附柱	50个	100个	室温
收集管	50个	100个	室温

注意:使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇,加入体积请参照瓶体上的标签。溶液P1在使用前先要将试剂盒中提供的RNaseA全部加入,混匀,置于2-8 $^{\circ}$ C保存。如非指明,所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

### 实验步骤(仅供参考):

1. 取1-5mL细菌培养物,12000rpm离心1min,吸除上清(菌液浓度较低时可多次离心收集到一个离心管中)。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入200 $\mu$ L溶液P1(请先检查是否已加入RNaseA),使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意:如果菌块未彻底混匀,会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。
3. 向离心管中加入200 $\mu$ L溶液P2,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5min,以免质粒受到破坏。
4. 向离心管中加入200 $\mu$ L溶液P3,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。12000rpm离心10min,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:溶液P3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。
5. 加入上清1/5体积的冰上预冷的内毒素清除剂,振荡混匀,溶液变浑浊,冰浴2min至溶液变清亮。
6. 37 $^{\circ}$ C水浴5min,不时振荡,溶液又变浑浊。12000rpm室温离心5min,溶液应分为两相,上层水相含质粒DNA,下层油相含内毒素。
7. 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。重复步骤5-7三次。
8. 加入600 $\mu$ L的溶液P4,充分混匀后加入吸附柱中,室温放置2min,12000rpm离心1min,倒掉收集管中的废液,



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

将吸附柱重新放回收集管中。如果溶液量多可分多次加入。

9. 向吸附柱中加入600 $\mu$ L漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm离心1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
10. 向吸附柱中加入600 $\mu$ L漂洗液, 12000rpm离心1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
11. 12000rpm离心2min, 将吸附柱敞口置于室温或50 $^{\circ}$ C温箱放置数分钟, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR等。
12. 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50-200 $\mu$ L经65 $^{\circ}$ C水浴预热的洗脱液, 室温放置2min, 12000rpm离心1min。
13. 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中, 室温放置2min, 12000rpm离心1min。

#### 注意事项:

1. 使用前请先检查溶液P2、P3和P4是否出现混浊, 如有混浊现象, 可在37 $^{\circ}$ C水浴中加热几分钟, 待溶液恢复澄清后再使用。
2. 洗脱缓冲液体积不应少于50 $\mu$ L, 体积过小影响回收效率; 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 $^{\circ}$ C, 以防DNA降解。
3. 质粒DNA浓度 $>1\text{mg/mL}$ 时清除内毒素效率降低。由于质粒DNA本身的性质, 清除过程可导致部分质粒DNA丢失, 但内毒素却能得到最大限度清除。
4. 所有溶液应用无内毒素的高纯水配制, 所有器械材料均应不含内毒素, 玻璃器皿可高温烘烤, 非挥发性水溶液可高压处理。
5. 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可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。DNA应在OD<sub>260</sub>处有显著吸收峰, OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50 $\mu\text{g/mL}$ 双链DNA、40 $\mu\text{g/mL}$ 单链DNA。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>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。

有效期: 12个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com