



快速无内毒素质粒小提中量试剂盒

(离心柱型-细胞转染级别)

产品编号	规格
K113-T	10 次
K113-S	50 次
K113-M	100 次
K113-L	250 次

提取得率

质粒类型	菌液量	得率
低拷贝	5-15ml	5-25 μ g
高拷贝	5-15ml	15-70 μ g

产品简介

本试剂盒对传统的碱裂解法进行了优化，可以在 30 min 内获得高质量、无内毒素的质粒 DNA。优化的裂解液可以使得离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA，本试剂配备了能特异性结合内毒素的多肽物质，能在离心柱上吸附内毒素，实现柱上去内毒素，操作简单。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，高效、专一吸附 DNA。以下操作步骤适用于提取 5-15 ml 过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

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、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

一、试剂盒组成、储存条件

试剂盒组成	保存	10 次	50 次	100 次	250 次
溶液 P1	4°C	6ml	30ml	65ml	150ml
溶液 P2	室温	6ml	30ml	65ml	150ml
溶液 P3	室温	8ml	40ml	90ml	200ml
溶液 P4	室温	8ml	30ml	60ml	150ml
漂洗液 WA	室温	6ml	18ml	36ml	72ml
漂洗液 WB	室温	3ml	12ml	24ml	48ml
洗脱液 EB	室温	5ml	15ml	30ml	30ml
RNaseA (10mg/ml)	-20°C	75µl	350µl	650µl	1.75ml
过滤注 (CS)	室温	10 个	50 个	100 个	250 个
吸附柱 A1	室温	10 个	50 个	100 个	250 个
2ml 收集管	室温	10 个	50 个	100 个	250 个
说明书	室温	1 份	1 份	1 份	1 份

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。低温条件下保存时，若溶液 P2 产生沉淀，请先将溶液 P2 室温 (20-30°C) 条件下放置一段时间，必要时可放 37 °C 水浴中温浴 10 min，以溶解沉淀。

二、实验前准备

- 使用前，请把 RNaseA 全部加入到溶液 P1 中，混匀后再使用，4°C 保存。
- 使用前，请按下表准确加入 98-100% 的乙醇。

	K113-T	K113-S	K113-M	K113-L
漂洗液 WA	6ml	18ml	36ml	72ml
乙醇	4ml	12ml	24ml	48ml



	K113-T	K113-S	K113-M	K113-L
漂洗液 WB	3ml	12ml	24ml	48ml
乙醇	12ml	48ml	96ml	192ml

三、操作步骤 A (离心法)

1. 取15ml过夜培养的菌液，室温下 $13,000\times g$ 离心1 min收集菌体，尽量移除上清。菌液较多时，可以通过多次离心收集菌体。

注意：请按照15ml过夜培养的菌液进行实验，以确保足够的质粒，低拷贝建议20ml收菌。

2. 加入500 μ l 溶液P1 (含RNaseA)，涡旋振荡使菌体沉淀彻底悬浮。

3. 加入500 μ l 溶液P2，温和地上下翻转4-7次，使菌体充分裂解，室温下静置1min，裂解时间不要超过3min，此时菌液应变的清亮粘稠。

注意：此操作避免剧烈混匀，否则容易导致基因组DNA污染。裂解时间不宜超过3 min，以免质粒受到破坏。如果溶液未变的清亮，则可能是由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体总量，或相应增加溶液P1、P2、P3的量。

4. 加入700 μ l 溶液P3，立即上下翻转7-10次，充分混匀，此时会有白色絮状沉淀出现。

5. 室温下， $\geq 13,000\times g$ 离心3min，此时在离心管底部形成白色沉淀。

6. (可选) 离心后若上清液仍旧浑浊可将上清液分次加入过滤柱CS (过滤柱已放入套管中)， $13000\times g$ 离心1 min，并将滤液收集在干净的2ml收集管中。

6. 将步骤5离心后的上清液转移至干净的2ml收集管中并向滤液中加入1/3滤液体积的溶液P4 (一般为500 μ l，如加入溶液P4过多容易导致RNA污染，) 上下颠倒混匀室温静置3分钟并转移至吸附柱A1中。

注意：吸附柱A1的最大容积为700 μ l，所以要分次过柱，且过滤后滤液可能会有损失，根据损失的不同来决定加入不同体积的溶液P4。

7. 室温下， $13,000\times g$ 离心1 min，倒掉套管中的滤液，将吸附柱A1放回收集管中，继续过柱。

注意：将第6步中所得的溶液，分次过柱，每次均按以上条件操作，也可以通过负压装置使得所有液体通过吸附柱。

8. 加入500 μ l漂洗液WA (使用前请检查是否已加入乙醇)，室温下， $13,000\times g$ 离心1min，弃滤液；

9. 加入500 μ l 漂洗液WB (使用前请检查是否已加入乙醇)，室温下， $13,000\times g$ 离心1 min，倒掉收集管中的滤液。

10. 重复步骤9一次。

11. 室温下， $13,000\times g$ 离心2 min，去除残留在吸附柱A1上的漂洗液。

注意：此步非常重要，吸附柱A1上残留的乙醇会影响后续的酶切、测序等实验。



12.将吸附柱A1放在一个干净的1.5 ml离心管中，向硅胶膜中间滴加100-200 μ l 洗脱液EB或灭茵去离子水，室温下静置1min，然后13,000 \times g 离心1min。

注意：① 洗脱液EB的洗脱体积应不少于100 μ l，体积过小会影响质粒的洗脱效率。

② 洗脱液的PH值对于洗脱效率有很大影响，建议使用洗脱液EB进行洗脱，也可用PH值在7-8之间的去离子水进行洗脱。

③ 为提高质粒的洗脱效率，可以将洗脱液EB或去离子水放在60-70 $^{\circ}$ C水浴中，预热5-8min后再使用。

13. 将质粒保存于4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C条件下。



五、操作步骤 B (负压法)

步骤1-6同离心法。

7. 将吸附柱A1连到负压装置 (如真空抽滤盒) 上, 将第6步离心获得的上清液转移到吸附柱 A1中, 开启并调节负压至500-800毫米汞柱, 缓慢吸走液体。
8. 加入500 μ L漂洗液WA, (使用前请检查是否已加入乙醇), 室温下, 开启并调节负压至 500-800毫米汞柱, 缓慢吸走液体。
- 9.加入500 μ l 漂洗液WB (使用前请检查是否已加入乙醇), 室温下, 开启并调节负压至 500-800毫米汞柱, 缓慢吸走液体
再重复步骤9一次。
之后步骤同离心法11-13步。

六、流程图

