AipFast Plus 无内毒素大型质粒大提试剂盒(溶液型,转染级)

AipFast Plus Endo-Free Large Plasmid Maxi Kit(Solution Type, Transfection Grade)

使 用 说 明 书

◆货号：PE405

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	20 次(PE405-01)
RNaseA(10mg/mL)	4℃	1.3mL
溶液 P1	4℃	130mL
溶液 P2	室温	100mL
溶液 PⅢ	室温	100mL
杂质清除剂 A	室温	3mL
杂质清除剂 B	室温	30mL
内毒素清除剂	-20℃	10mL

◆适用范围：适用于大量高纯或者转染级质粒制备和BAC/PAC大型质粒制备。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存12个月，不影响使用效果。

◆储存事项：

1. 第一次使用时，将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后(终浓度 100μg /mL)置于 4℃保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
2. 内毒素清除剂在 4℃可保存一个月，如果要长期保存，建议保存在－20℃。
3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃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。
4. 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：

本试剂盒用碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA，采用爱普科学独特的溶液配方和内毒素清除试剂，只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质，获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD260/280 通常在 1.8 左右，得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在 1.5mL 小离心管中操作，方法简单，不需特殊设备，无需过柱，不用酚

氯仿抽提；基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒，不必担心质粒 DNA 的丢失。

本方法提取纯化质粒 DNA，对质粒损伤小，即使是 10kb 甚至 100kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒，只要碱裂解法能够提取，就可以有效纯化。可选择任意小体积溶解质粒，浓度可高达 5μg/μL。超螺旋比例可高达 95%，配备了爱普科学独特的专用内毒素清除剂，提取的质粒纯度非常高，提取的质粒内毒素含量极低(<0.1 EU/ug DNA)，提取的质粒除用于常规的 PCR、酶切、转化等实验外，还非常适合用于原生质体转染实验。

◆产品特点：

1. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
2. 快速方便、从 150-200mL 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 0.5-2mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90%。
3. 获得的质粒产量高，超螺旋比例可高达 95%，浓度可达 5μg/μL，纯度好，可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。
4. 提取的质粒内毒素含量极低(<0.1EU/μg DNA)，可直接应用于细胞转染。

◆注意事项：

1. 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 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、PIII的用量。
2. 提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪大了开口的吸头，防止机械剪切对 DNA 的损坏。
3. DNA 沉淀液沉淀离心后，可能看不到明显沉淀。如未见沉淀，担心 DNA 丢失，可保留上清液，待完成全部操作后电泳鉴定，以确定是否获得终产物(数百微克 DNA 离心沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块)。
4. 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。OD260 值为 1 相当于大约 50μg/mL DNA。电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 95%。
5. 质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道确切大小。

◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项)：

提示：将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，使用后置于 2-8℃保存。

1. 取过夜培养菌 150mL 左右菌液(最大不超过 180mL-200mL)，装入合适的离心瓶中，10,000xg 于 4℃离心 2 min 沉淀菌体，完全弃除上清。
2. 加入 5mL 溶液 P1，充分混悬震荡菌体沉淀，使其完全分散开，至无絮块存在。细菌悬液移入 50mL 离心管中，室温放置 3~5 min。

   注：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。
3. 加入 5mL 溶液 P2，轻轻颠倒离心管 6~8 次，室温放置 4-5 min，使细菌完全裂解，溶液透明。

   注：温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时不应超过 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。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。

   注：P2 溶液时间长了可能裂解效率降低，如果碰到不明原因的提取质粒产量降低，可以尝试新鲜配制 P2 溶液(P2 溶液配方：1% SDS，0.2 M 氢氧化钠)可能提高产量。
4. 加 5mL 溶液 PIII，立即颠倒离心管 6~8 次，充分混匀，至白色絮状物产生。上述裂解液于 4℃ 12,000~16,000xg 离心 10~15 min，小心吸出上清，移入新的 50mL 离心管中。

   注：加入溶液 PIII后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. 加入 10mL 异丙醇，颠倒离心管，充分混匀。

   注：使用异丙醇沉淀，蛋白杂质和盐离子共沉淀较少，可能看不到明显的较大团块沉淀，但是质粒还是可以完全沉淀下来，不影响实际的质粒产量。如果你习惯看见较大的沉淀团块操作，可以选择 2 倍体积的无水乙醇沉淀。
6. 于 4℃ 12,000~16,000xg 离心 10 min，小心弃去上清，倒置于吸水纸上轻轻沥干残余液体，加入 3-5mL 70%乙醇漂洗一遍，最高速离心 5 分钟，弃上清，晾干沉淀。

   注：DNA 沉淀如果干燥过头，DNA 将无法完全溶解，但是如果乙醇没有晾干挥发干净，残留太多，也会造成 DNA 无法完全溶解。

   注：异丙醇离心沉淀后，质粒纯度很高吸附在管底和侧壁可能看不见沉淀，但是不影响产量，后续步骤仔细吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗溶解质粒。
7. 加入 1.4mL 溶液 P1 完全溶解沉淀团块，注意附着在管底和侧壁上的质粒沉淀虽然可能看不见，也要吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗下来(大质粒可用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解)。然后将质粒溶液转入 2 个新的 1.5mL 离心管中(每个 700μL)。

   可选步骤(一般不需要)：如果菌株 RNA 丰富有微量 RNA 残留，可在此步骤后将质粒溶液 60℃孵育 15 min 消化 RNA。

8. 每管加入 55μL 杂质清除液 A，颠倒充分混匀后加入约 0.1 体积(约 80μL)冰预冷的内毒素清除剂，颠倒旋转 7-10 次(30 秒左右)充分混匀，冰浴或者冰上放置>=5 分钟，中间偶尔颠倒混匀几次。

   注：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。

   注：如果不需要去内毒素用于转染，可在此步骤只加入 55μL 杂质清除液 A，充分混匀后冰上放置 5 分钟，离心后小心取上清转入一个新管，直接接步骤 11。

9. 42℃水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后 42℃温育 5 分钟。

10. 室温 14,000xg 离心 5 min 分相(温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少 20℃以上室温离心或者保证冬季转头温度 20℃以上)。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。

    注：溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤 9-10。

11. 将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除液 B(约 750μL)，轻柔混匀，4℃ 14,000xg 离心 10 min，弃上清(注意不要丢失 DNA)，轻轻加入 1mL 70%乙醇洗涤，离心弃上清，共两次，室温倒置晾干 5~10 min 使乙醇完全挥发。

12. 每个离心管加适量 TE 或者纯水(100~200μL)溶解沉淀(可在 37℃水浴中振荡以辅助溶解)。要注意很多质粒 DNA 可能附着在离心管侧壁上，即使看不见，也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒 DNA。

    注：最后沉淀可以根据需要选择任意小体积溶解，这样可以得到很高浓度的转染级质粒 DNA(高达 5-10μg/μL)。如果有需要，客户也可以选择更大体积溶解。

==========

扫码关注我们