

AipFast Plus 无内毒素高纯度快速质粒小提试剂盒(离心柱型)
AipFast Plus Endo-Free High-Pure Rapid Plasmid Mini Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆货号：PE203

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次 (PE203-01)	100 次 (PE203-02)	200 次 (PE203-03)
平衡液	室温	5mL	10mL	20mL
RNaseA(10mg/mL)	4°C	150μL	300μL	600μL
溶液 P1	4°C	15mL	30mL	60mL
溶液 P2	室温	15mL	30mL	60mL
溶液 N3	室温	15mL	30mL	60mL
去蛋白液 PE	室温	16mL	32mL	64mL
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
内毒素清除剂	-20°C	5mL	10mL	20mL
漂洗液 WB	室温	13mL	26mL	52mL
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	15mL	30mL	60mL
吸附柱 AC 和收集管(2mL)	室温	50 套	100 套	200 套

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。内毒素清除剂常温运输，4 度可以保存一个月，-20°C 长期保存。

◆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，通过爱普科学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。

本试剂盒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/ μ g 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. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好，克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
3. 快速方便，从 1.5-4.5mL 过夜培养的菌液中，可提取出高达 20 μ g-50 μ g 纯净的高拷贝 DNA 质粒。
4. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低(<0.1 EU/ μ g 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、等各种分子生物学实验。

◆注意事项:

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒，建议接种单菌落于 1.5-4.5mL 加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 14-16 个小时，可提取出多达 20 μ g-50 μ g 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应适当加大菌体使用量，使用 5-10mL 过夜培养物，同时按比例增加 P1、P2、N3 的用量，其它步骤相同。
3. 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 50 μ g/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 90%。
4. 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，无法通过电泳知道其确切大小。
5. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在 -20°C。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

◆关于平衡液的使用：

1. **介绍：**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℃ 使沉淀完全消失。
2. **使用方法** 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。13000rpm 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。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项)：

提示 首次使用前请先在漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶中按照该组分标签上的指示，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℃ 保存。

1. 取 1.5-4.5mL 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。
注：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。
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 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。
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。
注：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。
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(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。
注：如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42℃ 水浴，将很快变浑浊，颠倒混

匀。

7. 室温 14,000xg 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。

注：平衡液预处理吸附柱：使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，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 370 μ L)后充分颠倒混匀后分两次(每次不超过 700 μ L)转入吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中)，12,000xg 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 500 μ L 去蛋白液 PE，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。

注：此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤 如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5 α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

10. 加入 600 μ L 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 600 μ L 漂洗液 WB，重复漂洗一次。

11. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000rpm 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。

12. 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 50-100 μ L 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ 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。

注：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 30 μ L，体积小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

=====

