

AipFast 无内毒素高纯度快速质粒大提试剂盒(离心柱型)

AipFast Endo-Free High-Pure Rapid Plasmid Maxi Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆货号：PE402

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10次(PE402-01)
RNaseA(10mg/mL)	4°C	750μL
溶液 P1	4°C	77mL
溶液 P2	室温	77mL
溶液 N3	室温	77mL
去蛋白液 PE	室温	64mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	50mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20mL
吸附柱 DC 和收集管(50mL)	室温	10套

◆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：

- 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 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 可能会析出出现浑浊或者沉淀，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，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。

本试剂盒提取的质粒纯度很高，并去除了大部分内毒素，除用于常规的 PCR、酶切、转化等实验外，还可以直接用于原生质体转染等一般的转染实验。如果对于转染要求特别高的客户，需要提取的质粒内毒素含量极低的话，可以选择本款试剂盒的升级版本：PE403/ AipFast Plus 无内毒素高纯度快速质粒大提试剂盒(离心柱型)，升级版本(货号：PE403)配备了爱普科学独家的专用内毒素清除剂，提取的质粒内毒素含量极低(<0.1 EU/ug DNA)，当然，操作流程上也较本款试剂盒稍微复杂几步，客户可以根据自己具体的实验需求进行选择。

◆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. 独有的去蛋白液配方，可以高效去除残留的核酸酶，即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除，有效防止了质粒被核酸酶降解。
3. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
4. 快速方便，从 150-300mL 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%左右。
5. 获得的质粒产量高、超螺旋比例高、纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

◆注意事项：

1. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 12,000xg，带 50mL 转头的台式离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。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、N3 的用量，洗脱缓冲液应在 70°C 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，提高提取效率。
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 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 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 -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。

◆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°C 保存。

1. 取 150-200mL(最多不超过 300mL)过夜培养的菌液，12,000xg(约 10,000rpm)，离心 1-2 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
注：收集超过 50 毫升菌液，可以离心弃上清后，在同一个 50mL 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 7.5mL 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者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 7.5mL 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 4-5 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。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
4. 加 7.5mL 溶液 N3，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。12,000xg 离心 10-15 分钟，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮的白色沉淀。
注：加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. 向上清中加入 0.5 体积异丙醇(约 10mL)后充分颠倒混匀后分多次(每次不超过 10mL，因个别情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10mL，以防产生漏液现象)转入吸附柱 DC 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。
6. 加入 10mL 去蛋白液 PE(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000xg 离心 1 分钟，弃掉废液。
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。
7. 加入 10mL 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000xg 离心 1 分钟，弃掉废液。再加入 10mL 漂洗液 WB，重复漂洗一次。
8. 将吸附柱 DC 放回空收集管中，最高速(最好大于 12,000xg)离心 3 分钟以干燥基质

膜上残留乙醇。打开盖子室温晾干 2-3 分钟。

注: 该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。

9. 取出吸附柱 DC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1-2mL 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热可提高产量)，室温放置 2 分钟，12,000xg 离心 1-2 分钟。

推荐: 为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 分钟，12,000xg 离心 1-2 分钟。洗脱两遍可提高浓度约 10%。

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，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量(最小不应少于 1mL)。

=====

