

AipFast 无内毒素高纯度快速质粒中提试剂盒(离心柱型)

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

使用说明书

◆版本号：231201

◆目录号：PE302

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	20 次 (PE302-01)	40 次 (PE302-02)
RNase A(10mg/mL)	4°C	500μL	1mL
平衡液	室温	10mL	20mL
洗脱缓冲液 EB	室温	20mL	40mL
漂洗液 WB	室温	25mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇	50mL
去蛋白液 PE	室温	40mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇	80mL
溶液 P1	4°C	50mL	100mL
溶液 P2	室温	50mL	100mL
溶液 N3	室温	50mL	100mL
吸附柱 MC(5mL) 和收集管(15mL)	室温	20 套	40 套

◆产品储存：室温运输和储存，保质期 12 个月。

◆储存事项：

1. 收到本试剂盒后请按照各组分标签储存条件尽快保存试剂盒内各组分。
2. RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输，收到后，不超过 25°C 室温至少保存 6 个月，4°C 保存 12 个月，长期保存可存放在-20°C。
3. 第一次使用时，可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°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量的 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
4. 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 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
5. 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：PE303/AipFast Plus 无内毒素高纯度快速质粒中提试剂盒(离心柱型)，升级版(货号：PE303)配备了爱普科学独特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. 操作安全，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
4. 快速便捷，从 30-70mL 大肠杆菌 LB(Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 100-500 μ g 纯净的高拷贝质粒 DNA。
5. 获得的质粒产量高、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，使用带 15mL 以上转头，且转速可以达到 8,000 \times g(约 9,000rpm)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，应适当加大菌体使用量，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°C 使沉淀完全消失即可。
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 500 μ L 的平衡液至柱子中。8,000 \times g(约 9,000 rpm)离心 1 min，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：第一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 30-50mL(最多不超过 75mL)过夜培养的菌液加入 50mL 离心管，8,000 \times g(约 9,000 rpm)，离心 1 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。
注：如使用 15mL 离心管，可以离心弃上清后，在同一个 15mL 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. 加 2.3mL 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 2.3mL 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 4-5min。
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 5min！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 2.3mL 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。8,000 \times g 离心 10 min，小心吸取上清至新管，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。

注: 如有漂浮白色沉淀, 可用吸头撇开浮沫伸入液面下吸取, 偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果, 后续过滤漂洗过程中都会去除。

5. **柱平衡:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中, 吸取 500 μ L 的平衡液至柱子中。8,000 \times g(约 9,000 rpm)离心 1 min, 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。

注: 平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力, 请使用当天处理的吸附柱。

6. 向第 4 步得到的上清中加入 0.5 倍体积异丙醇(约 3mL)后充分颠倒混匀后, 分多次转移混合液至吸附柱 MC 中, 8,000 \times g 离心 1 min, 弃滤液。

注: 个别情况下离心机转子倾角较大, 建议每次加入吸附柱的溶液体积为 3.5mL(不超过, 以防产生漏液现象)。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

7. 加入 3mL 去蛋白液 PE(请先确认已加入无水乙醇!), 8,000 \times g 离心 1 min, 弃滤液。

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。

8. 加入 3mL 漂洗液 WB(请先确认已加入无水乙醇!), 8,000 \times g 离心 1 min, 弃滤液。再加入 3mL 漂洗液 WB, 重复漂洗一次, 弃滤液。

9. 将空吸附柱放回收集管中, 8,000 \times g 离心 3 min 以干燥基质膜上残留乙醇。

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降低洗脱效率, 降低质粒产量。

10. 将吸附柱置于新的 15mL 离心管中, 室温晾干 2-3 min, 在吸附膜的中间部位加 0.5mL(可在 0.3mL-0.6mL 变化)洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-75 $^{\circ}$ C 水浴中预热可提高产量), 室温放置 3 min, 8,000 \times g 离心 1 min, 弃吸附柱, 将提取的质粒 DNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注: 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 min, 8,000 \times g 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%左右。

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 300 μ L, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。

=====



扫码关注我们