

去内毒素质粒小量提取试剂盒

产品货号：BA2001

产品规格：50T/100T

产品介绍：

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，根据离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的DNA的原理特异性提取质粒DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。

尚宝公司研制的内毒素清除剂，可最大限度地除去内毒素。从1-5mL大肠杆菌LB培养液中，可快速提取5-15μg高纯度质粒DNA，提取率达85-90%。使用本试剂盒提取的质粒DNA纯度高，可直接用于细胞转染等要求较高的实验，以及其他各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。

产品组成：

组份	50T	100T	保存条件
RNase A	300μL	500μL	-20℃
内毒素清除剂	20mL	40mL	2-8℃
溶液 P1	10mL	20mL	室温
溶液 P2	10mL	20mL	室温
溶液 P3	10mL	20mL	室温
溶液 P4	30mL	60mL	室温
漂洗液	15mL	15mL×2	室温
洗脱液	15mL	30mL	室温
吸附柱	50个	100个	室温
收集管	50个	100个	室温

注意：使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。溶液P1在使用前先要将试剂盒中提供的RNaseA全部加入，混匀，置于2-8℃保存。如非指明，所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

实验步骤（仅供参考）：

1. 取1-5mL细菌培养物，12000rpm离心1min，吸除上清（菌液浓度较低时可多次离心收集到一个离心管中）。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入200μl溶液P1(请先检查是否已加入RNaseA)，使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意：如果菌块未彻底混匀，会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。
3. 向离心管中加入200μL溶液P2，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。注意：混匀一定要温和，以免污染细菌基因组DNA，此时菌液应变得清亮粘稠，作用时间不要超过5min，以免质粒受到破坏。
4. 向离心管中加入200μL溶液P3，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。12000rpm离心10min，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，尽量不要吸出沉淀。注意：溶液P3加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
5. 加入上清1/5体积的冰上预冷的内毒素清除剂，振荡混匀，溶液变浑浊，冰浴2min至溶液变清亮。
6. 37℃水浴5min，不时振荡，溶液又变浑浊。12000rpm室温离心5min，溶液应分为两相，上层水相含质粒DNA，下层油相含内毒素。
7. 将含质粒DNA的上层水相转移至新管，弃下层油相，注意不要吸入油状相。重复步骤5-7三次。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

8. 加入600 μ L的溶液P4, 充分混匀后加入吸附柱中, 室温放置2min, 12000rpm离心1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。如果溶液量多可分多次加入。
9. 向吸附柱中加入600 μ L漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm离心1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
10. 向吸附柱中加入600 μ L漂洗液, 12000rpm离心1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
11. 12000rpm离心2min, 将吸附柱敞口置于室温或50 $^{\circ}$ C温箱放置数分钟, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR等。
12. 将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中央悬空滴加50-200 μ L经65 $^{\circ}$ C水浴预热的洗脱液, 室温放置2min, 12000rpm离心1min。
13. 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中, 室温放置2min, 12000rpm离心1min。

注意事项:

1. 使用前请先检查溶液P2、P3和P4是否出现混浊, 如有混浊现象, 可在37 $^{\circ}$ C水浴中加热几分钟, 待溶液恢复澄清后再使用。
2. 洗脱缓冲液体积不应少于50 μ L, 体积过小影响回收效率; 洗脱液的pH值对洗脱效率也有影响, 若需要用水做洗脱液应保证其pH值在8.0左右(可用NaOH将水的pH值调至此范围), pH值低于7.0会降低洗脱效率。DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C, 以防DNA降解。
3. 质粒DNA浓度>1mg/mL时清除内毒素效率降低。由于质粒DNA本身的性质, 清除过程可导致部分质粒DNA丢失, 但内毒素却能得到最大限度清除。
4. 所有溶液应用无内毒素的高纯水配制, 所有器械材料均应不含内毒素, 玻璃器皿可高温烘烤, 非挥发性水溶液可高压处理。
5. DNA浓度及纯度检测: 得到的质粒DNA纯度与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的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。DNA应在OD₂₆₀处有显著吸收峰, OD₂₆₀值为1相当于大约50 μ g/mL双链DNA、40 μ g/mL单链DNA。OD₂₆₀/OD₂₈₀比值应为1.7-1.9, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为pH值和离子存在会影响吸光值, 但并不表示纯度低。

有效期: 12个月。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>