碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线：400-168-3301或800-8283301
订货e-mail：order@beyotime.com
技术咨询：info@beyotime.com
网址：http://www.beyotime.com

碧云天网站　微信公众号

质粒大量抽提试剂盒(通用型)

产品编号	产品名称	包装
D0028	质粒大量抽提试剂盒(通用型)	20次

产品简介：

- 碧云天的质粒大量抽提试剂盒(通用型) (Plasmid Maxi Preparation Kit for All Purpose, Plasmid Maxiprep Kit for All Purpose)是一种用于从大肠杆菌中进行大量质粒快速抽提的通用型离心柱式试剂盒。
- 本试剂盒不仅适用于常用的EndA$^-$菌株DH5α、JM109和XL-1 blue等，也适用于EndA$^+$菌株如JM110、BL21 (DE3)、TG1和HB101等，能有效避免EndA$^+$菌株中高丰度核酸酶的污染，并适用于从糖类修饰水平高的野生菌株中提取质粒。
- 野生型大肠杆菌中表达Endonuclease I，能切割并降解双链DNA。编码Endonuclease I的基因是*endA*，如果*endA*突变失活，其基因型会被标注为*endA1*，相应的突变菌株被称为EndA$^-$菌株，而野生型菌株则被称为EndA$^+$菌株。常见的EndA$^-$和EndA$^+$菌株参见附表1。从EndA$^+$菌株中抽提的质粒，微量核酸酶和质粒结合而容易被共纯化，导致容易降解，而本试剂盒增加了特殊的洗涤步骤(核酸酶洗涤液溶液PB洗涤)，可以有效避免EndA$^+$菌株中抽提获得的质粒容易降解的问题(参考图1)。

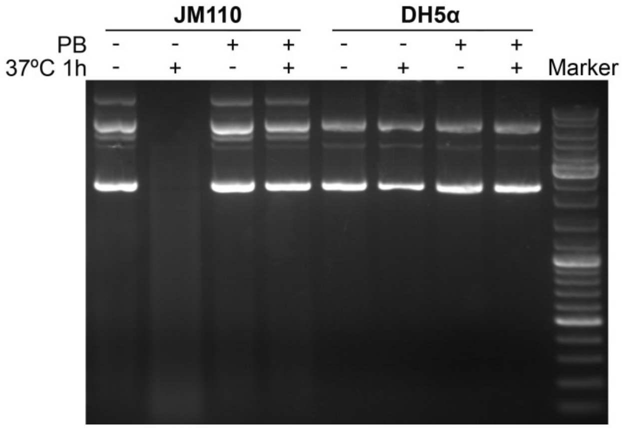

图1. 使用溶液PB可以使从EndA$^+$菌株JM110中抽提的质粒不易降解，而对于EndA$^-$菌株DH5α中抽提的质粒没有影响。使用本试剂盒时，如上图所示，在使用和不使用溶液PB时的质粒得率一致。但对于EndA$^+$菌株JM110，不使用溶液PB时从其中抽提获得的质粒在内切酶缓冲液Buffer Y中37°C孵育1小时后会全部降解，而使用溶液PB时同样孵育1小时就不会降解。对于EndA$^-$菌株DH5α无论是否使用溶液PB，抽提获得的质粒的都很稳定。

- 本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱。在特定条件下，使质粒能在离心过柱的瞬间，结合到质粒纯化柱上，在一定条件下又能将质粒充分洗脱，从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提，无需酒精沉淀，6个样品只需不足90分钟即可完成。
- 每个质粒纯化柱可以结合的质粒量的上限约为500微克。每个纯化柱可用于抽提约100毫升用LB培养过夜的大肠杆菌。抽提所得质粒的OD260和OD280比值一般在1.80左右。抽提获得的质粒量会受质粒拷贝数等因素影响。抽提获得的质粒DNA的OD260和OD280比值也会因菌种不同等原因而略有波动。
- 本试剂盒抽提所得到的质粒可直接用于转染细胞，DNA测序，PCR，基于PCR的突变，体外转录，转化细菌，内切酶消化等。本试剂盒在使用溶液PB的情况下，获得的质粒的纯度更高，内毒素含量低，总体上转染细胞的效率会显著提供。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D0028-1	溶液I (悬浮液)	105ml
D0028-2	溶液II (裂解液)	105ml
D0028-3	溶液III (结合液)	150ml
D0028-4	溶液PB (核酸酶洗涤液)	210ml
D0028-5	溶液IV (洗涤液)	100ml (第一次使用前加入150ml无水乙醇)
D0028-6	溶液V (洗脱液)	60ml
D0028-7	RNase A (100mg/ml)	105µl
D0028-8	大抽质粒纯化柱及废液收集管	20套
—	说明书	1份

保存条件:

室温保存，一年有效。

注意事项:

- **第一次使用前把试剂盒提供的RNase A全部加到溶液I (悬浮液)中，混匀，并在瓶上做好标记。加入RNase A后4ºC存放。**
- **第一次使用前请根据说明书和瓶上的标示，在每瓶溶液IV (洗涤液)中加入150ml无水乙醇，混匀，并在瓶上做好标记。**
- 温度较低时，溶液II和溶液III可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀，37ºC水浴加热溶解，混匀后使用。溶液II请勿过分剧烈混匀，否则会产生大量气泡。
- 溶液II使用完后，一定要盖紧瓶盖，防止被空气中二氧化碳酸化。
- 溶液II有强碱性，溶液II、溶液III、溶液PB和溶液IV对人体都有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
- 废液收集管在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. **取过夜菌至50毫升离心管内，5000g离心1分钟收集细菌沉淀，弃上清。再重复一次，每管共收集100毫升过夜菌沉淀。**
   通常大肠杆菌宜用LB培养过夜(16小时左右)至OD值为2-4。建议5000g(通常为5000rpm左右)室温离心1分钟，如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密，不利于加入溶液I后散开沉淀。直接倒掉上清，再倒入约50毫升菌液并重复上述操作，然后倒置于吸水纸上(可用普通草纸)，使液体流尽。如果细菌密度明显偏低，可考虑使用更多菌液，再重复上述操作1-2次。对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过150毫升，对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过200毫升。过量的细菌会导致后续的裂解不充分。
2. **每管加入5毫升溶液I，重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开，无可见细菌团块。**
   确认溶液I中已经添加了RNase A。最高速度vortex 5-10秒或更长时间，悬起沉淀。一定要充分混匀，对着光亮处观察应呈均匀的悬浊液，无明显细菌团块或絮块。如果没有vortex，可以用枪吹打沉淀使沉淀逐渐散开或用手指把沉淀弹开。
3. **每管加入5毫升溶液II，轻轻颠倒离心管4-6次，室温放置1-2分钟，使细菌完全裂解，溶液透明。**
   切勿vortex！vortex或其它剧烈操作会导致基因组DNA断裂，易导致最终所得质粒被基因组DNA污染。颠倒4-6次后，溶液应变得透明，无团块或絮状物。如果加入溶液I后细菌没有完全散开，那么颠倒4-6次后，可能还会有团块或絮状物。遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数3-5次，再室温放置2-3分钟，但总裂解时间不可超过5分钟。
4. **每管加入7毫升溶液III，随即颠倒离心管4-6次混匀，可见白色絮状物产生。**
   切勿vortex！颠倒次数也不宜过多，否则易导致最终所得质粒的质量下降。
5. **12,000-14,000rpm室温离心10分钟。**
   如果离心机的最高速度较低，例如约5000-6000rpm时，需要适当延长离心时间，例如20-30分钟，直至沉淀充分。离心时可以准备好质粒纯化柱，自制漏斗等，并在纯化柱上标上记号。
6. **将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。12,000-14,000rpm离心2分钟，倒弃收集管内液体。**
   质粒倒入质粒纯化柱后，可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。本步骤及后续需要12,000-14,000rpm离心2分钟的步骤，如果离心机的最高速度较低，需要适当延长离心时间，例如约5000-6000rpm时需要离心约5分钟或更长时间，直至液体全部穿柱。如果离心后有少量漂浮物，可以考虑再次离心，或者使用擦镜纸两次对折后打开形成的自制漏斗，以过滤去除漂浮物。
7. **(可选做)在质粒纯化柱内加入 10 毫升溶液 PB，12,000-14,000rpm 离心 2 分钟，洗去核酸酶污染等杂质，倒弃收集管内液体。**
   本步骤对于从EndA$^+$菌株如JM110、BL21(DE3)、TG1和HB101等中提取质粒并去除核酸酶污染是必须的，对于从其它任何具有较高核酸酶表达水平和糖类修饰水平的菌株中提取质粒也是非常必须的。参考图1，对于一些常用的EndA$^-$菌株如DH5α和XL-1 blue等如果后续仅用于酶切、PCR、反转录等常规分子生物学操作，并不需要本步骤。如果抽提获得的质粒用于细胞转染，宜增加本步骤。
8. **在质粒纯化柱内加入12毫升溶液IV，12,000-14,000rpm离心2分钟，洗去杂质，倒弃收集管内液体。**
   加入溶液IV后可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。
9. **12,000-14,000rpm再次离心2分钟，除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。**
   注意：倒弃收集管内液体后再离心，才能彻底去除微量的溶液IV。微量的溶液IV会影响质粒的质量。
10. **将质粒纯化柱置于洁净50毫升离心管上，加入2毫升溶液V至管内柱面上，放置2分钟。**
    也可以用重蒸水或 Milli-Q级纯水替代溶液V，但是水的pH应不小于6.5。溶液V加入后放置时间稍长，对于增加质粒产量会略有帮助。如想得到较高浓度的质粒，可以加入1毫升溶液V洗脱，质粒得率实测减少约5-10%，具体减少量与特定样品有关。
11. **12,000-14,000rpm离心2分钟，所得液体即为高纯度质粒。**
    通常所得质粒浓度为0.1-0.3mg/ml左右。如果想得到高浓度的质粒，
    采用如下的异丙醇沉淀方法浓缩质粒或常规的乙醇沉淀方法。
    a. **加入0.7倍体积的常温异丙醇(例如1毫升待浓缩质粒中加入0.7毫升异丙醇)，混匀后1,2000-14,000rpm 4ºC离心10分钟，小心吸去上清液，避免触及沉淀。**
       如果希望获得较高浓度的质粒，在洗脱时推荐采用1毫升洗脱液进行洗脱，后续可以转移到2毫升离心管内进行异丙醇沉

淀，这样操作起来相对比较方便。异丙醇沉淀的DNA为玻璃状近透明的颗粒状沉淀，和乙醇沉淀产生的含盐沉淀物相比较难观察清楚。离心后取放离心管要尽量轻柔，避免沉淀松动或部分颗粒状悬浮至溶液中。不推荐直接倒弃上清，直接倒弃上清时经常出现直接把质粒沉淀倒掉的情况；如果偏好直接倒弃上清，建议把上清倒弃至一洁净离心管内，这样万一沉淀被倒出，仍然可以从洁净离心管中回收。推荐用移液枪吸去上清，并注意尽量避免吸走沉淀。

b. **加入1毫升常温70%乙醇溶液，轻轻悬起质粒沉淀以充分洗涤，12,000-14,000rpm 4ºC离心5-10分钟，小心吸去上清液，避免触及沉淀。**

c. **5,000-10,000rpm 4ºC离心5-10秒，用20微升或200微升移液器小心吸净残留液体，避免触及沉淀。**

d. **肉眼观察无明显液体后(吸净液体后通常在1分钟内即可完成干燥)，加入适当体积的溶液(如溶液V、10mM Tris-Cl pH8.5或Milli-Q级纯水)溶解DNA。**
DNA样品不能过于干燥，否则很难溶解。最好在弱碱性条件下溶解DNA，溶解时可用缓冲液反复冲洗管壁，使管壁上的DNA充分溶解。

附表1. EndA$^-$ and EndA$^+$ strains of *E. coli*.

EndA$^-$	EndA$^+$
BJ5183	BL21(DE3)
DH1	CJ236
DH20	HB101
DH21	JM83
DH5α	JM101
JM103	JM110
JM105	LE392
JM106	MC1061
JM107	NM522 (all NM series are EndA$^+$)
JM108	NM554
JM109	P2392
MM294	PR700 (all PR series are EndA$^+$)
SK1590	Q358
SK1592	RR1
SK2267	TB1
SRB	TG1
TOP10	Y1088 (all Y10 series are EndA$^+$)
XL1-Blue	BMH 71-18
XLO	ES1301

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D0003	质粒小量抽提试剂盒	200次
D0005	质粒小量抽提试剂盒	50次
D0007S	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	50次
D0007M	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	200次
D0018	质粒中量抽提试剂盒	50次
D0020	质粒中量抽提试剂盒(通用型)	50次
D0026	质粒大量抽提试剂盒	20次
D0028	质粒大量抽提试剂盒(通用型)	20次

Version 2020.01.21