无内毒素质粒小提中量试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF118

产品内容

产品组成	GF118-02 / (50 preps)
溶液 P1 (Buffer P1)	30 ml
溶液 P2 (Buffer P2)	30 ml
溶液 P3 (Buffer P3)	30 ml
去内毒素溶液 ER (Endotoxin Removal Buffer ER)	24ml(使用前先加入 16ml 异丙醇)
漂洗液 PW (Buffer PW)	15ml（使用前请先加入 60ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	750 ul
过滤柱 CS1 (Filtration Columns CS1)	50 套（柱子无盖，收集管带盖）
吸附柱 CP2 (Spin Columns CP2)	50 个
收集管(2 ml)(Collection Tubes 2 ml)	50 个

储存条件

本试剂盒在室温（15-25℃）干燥条件下，可保存12个月；更长时间的保存可置于2-8℃（注意：当低温贮存时，使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在37℃水浴中预热10min，以平衡溶液温度）。单独包装的RNase A在室温可稳定保存12个月以上。加入RNase A后的溶液P1应置于2-8℃保存，可稳定保存12个月。

产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒DNA。同时采用特殊的去内毒素溶液ER和过滤柱CS1，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需1个小时，方便快捷。以下操作步骤适用于提取5-15ml过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒DNA可适用于转染多种细胞及各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液 P1 在使用前先加入 RNase A（**将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入**），混匀，置于 2-8℃保存。
2. 使用前先检查溶液 P2 和 P3 是否出现浑浊，如有混浊现象，可在 37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心，速度为 12,000rpm(~13,400×g)。
4. 去内毒素溶液 ER 在多次开盖使用后，可能会有细微的颜色变化，不影响最终质粒提取效率和纯度。
5. 提取的质粒量与细菌培养浓度、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、P3 的用量，洗脱缓冲液应在 65-70℃预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。

操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取5-15ml过夜培养的菌液加入离心管中，12,000rpm(~13,400×g)离心1min，尽量吸除上清。
   注意：菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌体量以能够充分裂解为佳，过多的菌体裂解不充分会降低质粒的提取效率。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入500ul溶液P1（**请先检查是否已加入RNaseA**），使用移液器吸吐或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。
   注意：请务必彻底悬浮细菌沉淀，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. 向离心管中加入500ul溶液P2，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。
   注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过5min，以免质粒受到破坏。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
4. 向离心管中加入500ul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，然后室温放置10min左右，12,000rpm(~13,400×g)离心10min，此时在离心管底部形成沉淀。
   注意：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. 将上一步收集的上清液分次加入过滤柱CS1（过滤柱放入收集管中），12,000rpm(~13,400×g)离心2min，小心地将过滤离心后收集管中得到的溶液分次加入吸附柱CP2中（**吸附柱放入收集管中**），（**如果过滤柱中有残余的液体，说明步骤4的上清中杂质过多，可以延长离心的时间；如果离心后收集管底部有少量的沉淀，尽量地吸取上清**）。
6. 12,000rpm(~13,400×g)离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP2放入收集管中。
7. 向吸附柱CP2加入750ul去内毒素溶液ER（**已经加入异丙醇**），静置2min使管柱膜平衡，室温12,000rpm(~13,400×g)离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
8. 向吸附柱CP2中加入700ul漂洗液PW（**请先检查是否已加入无水乙醇**），12,000rpm(~13,400×g)离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP2放入收集管中。
   注意：加入漂洗液PW后，如果室温静置2-5min，有助于更好地去除杂质。
9. 重复操作步骤8。
10. 将吸附柱CP2重新放回收集管中，12,000rpm(~13,400×g)离心2min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。
    注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱CP2开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。
11. 将吸附柱CP2置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加100-300ul洗脱缓冲液TB，室温放置2min，12,000rpm(~13,400×g)离心1min将质粒溶液收集到离心管中。
    注意：洗脱缓冲液体积不应少于100ul，体积过小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响，若后续做测序，需使用ddH$_2$O做洗脱液，并保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置2min，12,000rpm(~13,400×g)离心2min，将质粒溶液收集到离心管中。