

M5 HiPer 溶液型大型大量质粒提取试剂盒 (转染级) 使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 HiPer 溶液型大型大量质粒提取试剂盒（转染级）	50T	MF823-01

❖ Kit Contents and Storage

Kit Contents	Storage	20 Preps
RNaseA (10mg/ml)	-20°C	1.3ml
溶液 P1	4°C	130ml
溶液 P2	室温	100 ml
溶液 PIII	室温	110 ml
杂质清除剂 A	室温	3 ml
杂质清除剂 B	室温	30 ml
内毒素清除剂	-20°C	10 ml

本试剂盒在室温储存 18 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 100 μ g/ml) 置于 4°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留, 在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 内毒素清除剂在 4°C 可保存一个月, 如果要长期保存, 建议保存在 -20°C!
- 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。

❖ Description

本试剂盒用碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA, 采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂, 只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质, 获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD_{260/280} 通常在 1.8 左右, 得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在 1.5ml 小离心管中操作, 方法简单, 不需特殊设备, 无需过柱, 不用酚氯仿抽提; 基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒, 不必担心质粒 DNA 的丢失。本方法提取纯化质粒 DNA, 对质粒损伤小, 即使是 10kb 甚至 100kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒, 只要碱裂解法能够提取, 就可以有效纯化。可选择任意小体积溶解质粒, 浓度可高达 5 μ g/ μ l。超螺旋比例可高达 95%, 无内毒素, 转染效果好。

❖ Important consideration before use

1. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、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、PⅢ的用量。
2. 提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪大了开口的吸头，防止机械剪切对 DNA 的损坏。
3. DNA 沉淀液沉淀离心后，可能看不到明显沉淀。如未见沉淀，担心 DNA 丢失，可保留上清液，待完成全部操作后电泳鉴定，以确定是否获得终产物（数百微克 DNA 离心沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块）。
4. 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 95%。
5. 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，无法通过电泳知道确切大小。

❖ Procedure

提示：将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，使用后置于 2-8℃保存。

1. 取过夜培养菌 150 ml 左右菌液（最大不超过 180ml-200ml），装入合适的离心瓶中，10,000 x g 于 4℃离心 2 min 沉淀菌体，完全弃除上清。
2. 加入 5 ml 溶液 P1，充分混悬震荡菌体沉淀，使其完全分散开，至无絮块存在。细菌悬液移入 50 ml 离心管中，室温放置 3~5 min。

注意：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. 加入 5 ml 溶液 P2，轻轻颠倒离心管 6~8 次，室温放置 4-5 min，使细菌完全裂解，溶液透明。

温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。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. 加 5 ml 溶液 PⅢ，立即颠倒离心管 6~8 次，充分混匀，至白色絮状物产生。上述裂解液于 4℃ 12,000~16,000 x g 离心 10~15 min，小心吸出上清，移入新的 50 ml 离心管中。

加入溶液 PⅢ后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

5. 加入 10 ml 异丙醇，颠倒离心管，充分混匀。

注意：使用异丙醇沉淀，蛋白杂质和盐离子共沉淀较少，可能看不到明显的较大团块沉淀，但是质粒还是可以完全沉淀下来，不影响实际的质粒产量。如果你习惯看见较大的沉淀团块操作，可以选择 2 倍体积的无水乙醇沉淀。

6. 于 4℃ 12,000~16,000 x g 离心 10 min，小心弃去上清，倒置于吸水纸上轻轻沥干残余液体，加入 3-5ml 70%乙醇漂洗一遍，最高速离心 5 分钟，弃上清，晾干沉淀。

DNA 沉淀如果干燥过头，DNA 将无法完全溶解，但是如果乙醇没有晾干挥发干净，残留太多，也会造成 DNA 无法完全溶解。

注意：异丙醇离心沉淀后，质粒纯度很高吸附在管底和侧壁可能看不见沉淀，但是不影响产量，后续步骤仔细吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗溶解质粒。

7. 加入 1.4 ml 溶液 P1 完全溶解沉淀团块，注意附着在管底和侧壁上的质粒沉淀虽然可能看不见，也要吹打管底和沉淀所在的侧壁涮

洗下来（大质粒可用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解）。然后将质粒溶液转入 2 个新的 1.5 ml 离心管中（每个 700 μ l）。可选步骤（一般不需要）：如果菌株 RNA 丰富有微量 RNA 残留，可在此步骤后将质粒溶液 60 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 消化 RNA。

8. 每管加入 55 μ l 杂质清除液 A，颠倒充分混匀后加入约 0.1 体积(约 80 μ l)冰预冷的内毒素清除剂，颠倒旋转 7-10 次（30 秒左右）充分混匀，冰浴或者冰上放置 $\geq$ 5 分钟，中间偶尔颠倒混匀几次。

内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮。

注意：如果不需要去内毒素用于转染，可在此步骤只加入 55 μ l 杂质清除液 A，充分混匀后冰上放置 5 分钟，离心后小心取上清转入一个新管，直接接步骤 11。

9. 42 $^{\circ}$ C 水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后 42 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟。

10. 室温 14,000 x g 离心 5 min 分相（温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少 20 $^{\circ}$ C 以上室温离心或者保证冬季转头温度 20 $^{\circ}$ C 以上）。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。

溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤 9-10。

11. 将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除液 B（约 750 μ l），轻柔混匀，4 $^{\circ}$ C 14,000 x g 离心 10 min，弃上清（注意不要丢失 DNA），轻轻加入 1 ml 70%乙醇洗涤，离心弃上清，共两次，室温倒置晾干 5~10 min 使乙醇完全挥发。
12. 每个离心管加适量 TE 或者纯水（100~200 μ l）溶解沉淀（可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中振荡以辅助溶解）。要注意很多质粒 DNA 可能附着在离心管侧壁上，即使看不见，也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒 DNA。

最后沉淀可以根据需要选择任意小体积溶解，这样可以得到很高浓度的转染级质粒 DNA（高达 5-10 μ g/ μ l）。如果有需要，客户也可以选择更大体积溶解。