



高纯度质粒小量快速提取试剂盒

HighPure Rapid Mini Plasmid Kit

产品信息:

试剂盒组成	保存	DP102-01	DP102-02
		100 次	200 次
平衡液 BL	室温	30ml	60ml
RNaseA (10mg/ml)	室温	300μl	300μl×2
溶液 P1	4℃	30ml	30ml×2
溶液 P2	室温	30ml	30ml×2
溶液 P3	室温	40ml	40ml×2
去蛋白液 PE	室温	31.5ml	31.5ml×2
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
漂洗液 WB	室温	25ml	25ml×2
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml	10ml×2
吸附柱 AC	室温	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

保存条件: 本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

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。

产品特点:

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，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。
- 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.快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。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.第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100 μ g/ml）置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 2.环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37 $^{\circ}$ C 水浴加热几 min，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- 3.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
- 4.溶液 P3 和去蛋白液 PE 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
- 5.提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒，建议接种单菌落于 1.5-4.5ml 加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 14-16 个小时，可提取出多达 20 μ g 的纯净质粒。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，使用 5-10ml 过夜培养物，同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量，其它步骤相同。
- 6.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%。
- 7.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 $^{\circ}$ 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。

自备试剂：无水乙醇

操作步骤：

提示：

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶中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 $^{\circ}$ C 保存。

⇒ 将溶液 P3 放在冰上预冷，可以提高产量。

1. 向吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中)加 500 μ l 的平衡液 BL, 12,000rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
2. 取 1.5-4.5ml 过夜培养的菌液, 12,000rpm 离心 30 sec, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。**收集超过 1.5 ml 菌液, 可以离心弃上清后, 在同一个 1.5ml 管内加入更多的菌液, 重复步骤 1, 直到收集到足够的菌体。**
3. 用 250 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至彻底悬浮。
4. 加 250 μ l 的溶液 P2, 温和地上下翻转 4-7 次使菌体充分裂解。
5. 加 350 μ l 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 4-7 次, 充分混匀时会出现白色絮状沉淀, 13,000rpm 离心 10 min, 小心取上清。**加入溶液 P3 后应该立即混匀, 以免产生 SDS 的局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清**
6. 将上一步所得上清加入吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中), 12,000rpm 离心 30-60 sec, 倒掉收集管中的废液**可选步骤:**加入 500 μ l 去蛋白液 PE, 12,000rpm 离心 30-60 sec, 弃废液。**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 和 DH5 α 等缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 则可略过此步骤。**
7. 加入 500 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 sec, 弃掉废液。
8. 重复步骤 7。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 室温放置几分钟。
11. **在吸附膜的中间部位加 50 μ l-100 μ l 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 min, 12,000rpm 离心 1 min。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1 min。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 50 μ l, 体积小会降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。若用 ddH $_2$ O 做洗脱液, 应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。**