



高纯度质粒小提中量快速提取试剂盒

Highpure Rapid Mini Plasmid Kit II

产品信息:

试剂盒组成	保存	DP110-01 50 次
平衡液 BL	室温	30ml
RNaseA (10mg/ml)	室温	300μl
溶液 P1	4℃	30ml
溶液 P2	室温	30ml
溶液 P3	室温	40ml
去蛋白液 PD	室温	15ml×2
漂洗液 WB	室温	15ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml×2
吸附柱 BC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

保存条件: 本产品收到后按照上面指示温度存放各成份, 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:

1. 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。
2. 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 100ug/ml）置于 2-8℃ 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℃ 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。
- 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 PD 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 5ml-15ml 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 20μg 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 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 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℃。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 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℃ 保存。
- ⇒ 将溶液 P3 放在冰上预冷。

- 1.柱平衡步骤: 向吸附柱 BC 中 (吸附柱放入收集管中)加 500 μ l 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。(请使用当天处理柱子)
- 2.取 5-15 ml 过夜培养的菌液, 12,000rpm 离心 1 min, 尽可能倒干上清, 收集菌体。
- 3.用 500 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至彻底悬浮。
- 4.加 500 μ l 的溶液 P2, 温和地上下翻转 4 -7 次使菌体充分裂解, 室温放置 4 min。
- 5.加 700 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。12,000rpm 离心 10 min, 小心取上清。
- 6.将上一步所得上清分次加入吸附柱 BC 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。
- 7.可选步骤: 所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株时, 由于核酸酶含量丰富, 应加入 500 μ l 去蛋白液 PD, 12,000rpm 离心 30-60 sec, 弃废液。
- 8.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。
- 9.重复步骤 8。
- 10.将吸附柱 BC 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 min, 将吸附柱置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 11.取出吸附柱 BC, 放入一个干净的离心管中, 室温放置数分钟。
- 12.在吸附膜的中间部位加 100-300 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。