

版本号: 240418

HighYield Plasmid Midi Kit 高产质量粒小提中量快速提取试剂盒

目录号: PL18

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PL1801)	100 次 (PL1802)	200 次 (PL1803)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	250 µl	500 µl	1 ml
溶液 P1	4°C	25 ml	50 ml	100 ml
溶液 P2	室温	25 ml	50 ml	100 ml
溶液 N3	室温	25 ml	50 ml	100 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml	32 ml	64 ml
		第一次使用前按标签指示加指定量乙醇		
内毒素清除剂	4°C	10 ml	20 ml	40 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按标签指示加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	20 ml	40 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输, 收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放 -20°C。
2. 第一次使用时, 可将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100 µg/ml) 置于 4°C 可保存 3 个月左右。如果溶液 P1 中 RNase A 时间较久失活了, 提取的质粒可能有微量 RNA 残留, 在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

3. 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，重新混匀，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。

❖ 产品介绍：

本试剂盒采用独特的高产量 SDS-碱裂解法配方裂解细胞，质粒产量提高 1-2 倍。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. 特殊改进的高产量缓冲液配方可以把质粒产量提高 1-2 倍。
2. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，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。
3. 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。
4. 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. **所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成**，使用转速可以达到 12,000 rpm 的台式离心机。
2. 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 5-15 ml 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 40-90 μg 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应适当加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、N3 的用量，其它步骤相同。
3. 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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%。

4. **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。处于环状或超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。
5. 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。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶中按标签指示加入无水乙醇，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。

1. 取 5-15 ml 过夜培养的菌液，9,000 rpm 离心 1-2 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。加 500 μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮，全部转入一个 2 ml 离心管。
 - ▲ 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。
2. 加 500 μl 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 min。
 - ▲ 温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 min！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
3. 加 500 μl 溶液 N3，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。12,000 rpm 离心 10 min，小心吸取上清至新管，避免吸取到漂浮的白色沉淀。
 - ▲ 加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
4. **柱平衡：**向吸附柱中加入 100 μl 平衡液，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，备用。
 - ▲ 平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。

5. 向上一步得到的上清中加入 0.5 倍体积异丙醇（约 680 μl ）后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过 750 μl ）转入吸附柱中，12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
6. 加入 500 μl 去蛋白液 PE（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。
7. 加入 600 μl 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。再加入 600 μl 漂洗液 WB 重复漂洗一次，弃滤液。
8. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 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。
9. 取出吸附柱，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100 μl -200 μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 80°C-90°C 水浴中预热可提高产量），室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，弃吸附柱。
 - ▲ 推荐：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%。
 - ▲ 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，但是需注意体积小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量（最小不应少于 80 μl ）。