

版本号:240421

HighYield Plasmid Mini Kit 高产量质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PL15

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	100 次 (PL1502)	200 次 (PL1503)
平衡液	室温	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	250 µl	500 µl
溶液 P1	4°C	25 ml	50 ml
溶液 P2	室温	25 ml	50 ml
溶液 N3	室温	25 ml	50 ml
去蛋白液 PE	室温	32 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	64 ml
漂洗液 WB	室温	25 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	50 ml
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	20 ml
吸附柱 AC	室温	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	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 1.5-4.5 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 30-50 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 1.5-5 ml 过夜培养的菌液加入 1.5 ml 离心管，12,000 rpm 离心 30 sec，尽可能的倒干上清，收集菌体。
 - ▲ 如使用收集超过 1.5 ml 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5 ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
 2. 加 250 μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。
 - ▲ 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 250 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。
 4. 加 250 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。
 5. **柱平衡：**向吸附柱 AC 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。
 6. 向第 4 步得到的上清中加入 0.5 倍体积异丙醇（约 335 μl）后充分颠倒混匀

- 后，分多次转移混合液至吸附柱 AC 中， 12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。
7. 加入 500 μ l 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。
 8. 加入 600 μ l 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 μ l 漂洗液 WB 重复漂洗一次，弃滤液。
 9. 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。
 10. 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 50 μ l-100 μ l 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，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量（最小不应少于 30 μ l）。