

版本号:240821

Rapid Plasmid Mini Kit 快速质粒小量提取试剂盒

目录号: PL02

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 (PL0201) | 100 次 (PL0202) | 100 次 (PL0203) |
|-------------------|-----|------------------|-------------------|-------------------|
| 平衡液 | 室温 | 5 ml | 10 ml | 20 ml |
| RNase A | 4°C | 150 µl | 250 µl | 500 µl |
| 溶液 P1 | 4°C | 15 ml | 25 ml | 50 ml |
| 溶液 P2 | 室温 | 15 ml | 25 ml | 50 ml |
| 溶液 P3 | 室温 | 20 ml | 35 ml | 70 ml |
| 漂洗液 WB | 室温 | 13 ml | 25 ml | 50 ml |
| 第一次使用前按标签说明加指定量乙醇 | | | | |
| 洗脱缓冲液 EB | 室温 | 15 ml | 15 ml | 20 ml |
| 吸附柱 AC | 室温 | 50 个 | 100 个 | 200 个 |
| 收集管 (2ml) | 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. 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20-30 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，使用5-10 ml过夜培养物，同时按比例增加P1、P2、P3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。**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。

❖ 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°C 保存。

1. **柱平衡：**向吸附柱 AC 中加入 100 μ l 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。

2. 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。

3. 加 250 μ l 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。

4. 加 250 μ l 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。

5. 加 350 μ l 溶液 P3，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 2 min。

▲ 加入溶液 P3 后应立即混合，应快速上下颠倒混匀，避免产生局部沉淀。上清中含有少量微小白色沉淀对后续实验没有任何影响。如果上清中存在大量微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

6. 小心吸取上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中）。12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。

7. 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。

8. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 空甩离心 1 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. 将吸附柱置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB，12,000 rpm 离心 30 sec 将质粒溶液收集到离心管中。

▲ 注意:洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ l, 体积过小影响回收效率。