



质粒小量快速提取试剂盒

Rapid Mini Plasmid Kit

产品信息:

试剂盒组成	保存	DP101-01	DP101-02
		100 次	200 次
RNase A (干粉)	室温	1 支	2 支
溶液 P1	4℃	30ml	30ml×2
溶液 P2	室温	30ml	30ml×2
溶液 P3	室温	40ml	40ml×2
漂洗液 WB	室温	25ml 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇	25ml×2
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml	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. 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 100μg/ml) 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.本试剂盒适用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5a 等核酸酶含量低缺陷型菌株。**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,应购买本公司生产的高纯度质粒小量快速提取试剂盒。**

5.溶液 P3 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。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 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 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 (干粉)倒入溶液 P1 中并使用 P1 冲洗离心管,混匀,每次使用后置于 2-8℃ 保存。
- ⇒ 将溶液 P3 放在冰上预冷,可以提高产量。

1. 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。
2. 用 250μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀,涡旋振荡至彻底悬浮。
3. 加 250μl 的溶液 P2,温和地上下翻转 4-7 次使菌体充分裂解。

4. 加 350μl 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 5 min, 小心取上清。
5. 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。
6. 加入 500μl 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。
7. 重复步骤 6。
8. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2min, 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 AC, 放入一个干净的离心管中, 室温放置几分钟。
10. 在吸附膜的中间部位加 50μl-100μl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70℃ 水浴中加热效果更好), 室温放置 2min, 12,000rpm 离心 1min。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 1min。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 30μl, 体积小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。若用 ddH₂O 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。

20241119