

质粒小量快速提取试剂盒

Rapid Mini Plasmid Kit

货号: **GK80010100**

提取次数:100次

试剂盒组成	保存	100 次
平衡液BL	室温	60ml
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	300μl
溶液 P1	4℃	30ml
溶液 P2	室温	30ml
溶液 P3	室温	40ml
漂洗液 WB	室温	25ml 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱AC	室温	100 个
收集管 (2ml)	室温	100 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 100ug/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。**公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。**

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。

7. 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）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。
8. 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。
9. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
10. 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。
11. 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。
12. 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%。
13. 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 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，可以提高产量。
1. 向吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中）加 500μl 的平衡液 BL，12,000pm 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。

2. 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。
3. 用 250 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至彻底悬浮。
4. 加 250 μ l 的溶液 P2, 温和地上下翻转 4-7 次使菌体充分裂解。
5. 加 350 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 5 min, 小心取上清。
6. 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。
7. 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。
8. 重复步骤 7。
9. 将吸附柱 AC 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。
10. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 室温放置 10 min。
11. 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 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。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 30 μ l, 体积小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。