

版本号:190120

HighYield Plasmid Midi Kit

高产量质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)
平衡液	室温	5ml
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	250μl
溶液 P1	4℃	25 ml
溶液 P2	室温	25 ml
溶液 N3	室温	25 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	15 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 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. 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) 置于 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, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 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. 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。
3. 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. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
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，**过夜培养14-16个小时**，5-15ml 培养物可提取出高达40-90 μ g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，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 μ g/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。处于环状或者超螺旋状态的质粒，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 $^{\circ}$ C。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。

❖ 关于平衡液的使用

1. **介绍:** 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37℃ 使沉淀完全消失。
2. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100μl 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

提示：

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶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。
1. 取 5-15 ml 毫升过夜培养的菌液，9,000rpm 离心 1-2 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
 2. 用 500μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮，全部转入一个 2ml 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。
 3. 加 500μl 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 分钟。
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 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。
 4. 加 500μl 溶液 N3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。13,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮白色沉淀。

平衡液预处理吸附柱：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

5. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇（约 740μl）后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过 700μl）转入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000 x g 离心 1 分钟，

倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

6. 加入 500 μ l 去蛋白液 PE (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。

如此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质, 如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株, 核酸酶含量丰富, 应加此步骤; 如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5 α 等缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 则可略过此步骤。

7. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。再加入 600 μ l 漂洗液 WB, 重复漂洗一次。
8. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 分钟, 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, 在吸附膜的中间部位加 100-200 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 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。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, 室温放置 2 分钟, 离心 1 分钟。

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 100 μ l, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。