

版本号: 250919

HighPure Plasmid Midi Kit**高纯度质粒小提中量快速提取试剂盒（低内毒素型）**

目录号: PL16

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次 (PL1601)	100 次 (PL1602)	200 次 (PL1603)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	250 µl	500 µl	1 ml
溶液 P1	4°C	25 ml	50 ml	100 ml
溶液 P2	室温	25 ml	50 ml	100 ml
溶液 P3	室温	35 ml	70 ml	140 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml	32 ml	64 ml
		第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇		
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按瓶子标签指示加无水乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	20 ml	40 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	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 (终浓度 100 µg/ml) 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 会析出, 出现浑浊或者沉淀, 可在 37°C 水浴加热几分钟恢复澄清, 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改进 SDS-碱裂解法配方裂解细胞，配合特殊加厚膜设计离心柱，可以极大的增大质粒吸附容量，质粒产量比小提可提高 2-3 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如内毒素去除，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。提取的质粒纯度很高，并去除了绝大部分内毒素，除用于常规的 PCR，酶切，转化等实验外，还可以直接用于原生质体转染、细胞转染等一般的转染实验。特别要求高的细胞系转染可选择艾德莱的无内毒素质粒小提中量等提取试剂盒。

❖ 产品特点：

1. 特殊设计的加厚膜离心柱可以把质粒产量比小提提高 2-3 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、原生质体转染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 13,000 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 5-15 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 30-80 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、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。**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。

❖ **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 瓶中按瓶子标签指示加入无水乙醇，充分混匀，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，13,000 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 5-15 ml 过夜培养的菌液，9,000 rpm 离心 1-2 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。加 500 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮，全部转入一个 2 ml 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 500 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！所用时间一般不应超过 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 700 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。13,000 rpm 离心 10 min，小心吸取上清分多次加入吸附柱 AC 中（每次不超过 720 μ l），避免吸取漂浮的白色沉淀。13,000 rpm 离心 15 sec，弃滤液。重复直到所有上清通过此吸附柱。

▲ 加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

▲ 如有漂浮白色沉淀，可用吸头撇开浮沫伸入液面下吸取，偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果，上清中含有少量微小白色沉淀对后续实验无任何不良影响，后续过滤漂洗过程中都会去除。

5. 加入 500 μ l 去蛋白液 PE（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000 rpm 离心 15 sec，弃滤液。

▲ 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，残留核酸酶可能导致质粒降解或者下游酶切时候切散，应做此步骤；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，则可省略此步骤。

6. 加入 600 μ l 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 13, 000 rpm 离心 15 sec, 弃滤液。再加入 600 μ l 漂洗液 WB 重复漂洗一次, 弃滤液。
7. 将吸附柱放回收集管中, 13, 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。
8. 取出吸附柱, 放入一个干净的离心管中, **在吸附膜的中央悬空滴加** 100 μ l-150 μ l 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min, 13, 000 rpm 离心 1 min, 弃吸附柱。

▲ 以下步骤都可以帮助提高 DNA 产物浓度:

洗脱缓冲液事先在 80°C-100°C 水浴中预热可提高产量。

将第一次洗脱液重新加入吸附柱, 室温放置 1 min, 13, 000 rpm 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%。

▲ 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 60 μ l)。