

版本号:240621

HighYield Plasmid Mini Kit (Low Endotoxin) 高产量子粒小量快速提取试剂盒 (低内毒素型)

目录号: PL15

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	100 次 (PL1502)	200 次 (PL1503)
平衡液	室温	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	250 µl	500 µl
溶液 P1	4°C	25 ml	50 ml
溶液 P2	室温	25 ml	50 ml
溶液 N3	室温	25 ml	50 ml
去蛋白液 PE	室温	32 ml	64 ml
		第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇	
漂洗液 WB	室温	25 ml	50 ml
		第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	20 ml
吸附柱 AC	室温	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	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等一般的转染实验。特别要求高的困难细胞系转染可选择艾德莱的无内毒素质粒中量/大量等提取试剂盒。

❖ 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. 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30-50 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、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 μg/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. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 加 250 μ l 溶液 N3，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 10 min，小心吸取上清至新管，避免吸取漂浮的白色沉淀。
 - ▲ 加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. **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。
6. 向第 4 步得到的上清中加入 0.5 倍体积异丙醇（约 335 μ l）后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过 750 μ l）转入吸附柱中，12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
7. 加入 500 μ l 去蛋白液 PE（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 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 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可省略此步骤。

8. 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 15 sec，弃滤液。再加入 600 μ l 漂洗液 WB 重复漂洗一次，弃滤液。
9. 将吸附柱放回收集管中，12,000 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。
10. 取出吸附柱，放入一个干净的离心管中，向吸附膜的中央悬空滴加 50 μ l-100 μ l 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min。

▲ 洗脱体积建议不少于 30 μ l，体积过小会影响核酸回收效率。

▲ 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-90°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，12,000 rpm 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%。