

版本号:241021

## Rapid Plasmid Mini Kit 快速质粒小量提取试剂盒

目录号: PL02

### ❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PL0201)	100 次 (PL0202)	200 次 (PL0203)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	150 µl	250 µl	500 µl
溶液 P1	4°C	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 P2	室温	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 P3	室温	20 ml	35 ml	70 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml	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	15 ml	20 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：

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，可以 8 分钟快速获得高质量质粒 DNA。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. 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。
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、普通转染、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。
3. 本试剂盒适用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5 $\alpha$ 等常见核酸酶含量低缺陷型菌株。如果所用菌株为 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切散，应购买本公司生产的高纯度质粒小量快速提取试剂盒(PL03)，试剂盒含去蛋白液 PE，可以漂洗确保去除核酸酶残留。

## ❖ 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20-30  $\mu$ g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、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  $\mu$ 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。**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. **柱平衡：**向吸附柱 AC 中加入 100  $\mu$ 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 1.5-5 ml 过夜培养的菌液加入 1.5 ml 离心管，13,000 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。
3. 加 250  $\mu$ 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。
4. 加 250  $\mu$ 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。
5. 加 350  $\mu$ 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 2 min。
  - ▲ 加入溶液 P3 后应立即混合，应快速上下颠倒混匀，避免产生局部沉淀。上清中含有少量微小白色沉淀对后续实验没有任何影响。如果上清中存在大量微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
6. 小心吸取上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中）。13,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。
7. 加入 600  $\mu$ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），13,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。
8. 将吸附柱放回收集管中，13,000 rpm 空甩离心 1 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

9. 将吸附柱置于一个干净的离心管中，向吸附膜的**中央悬空滴加** 50-100  $\mu\text{l}$  洗脱缓冲液 EB，13,000 rpm 离心 30 sec 将质粒溶液收集到离心管中。
- ▲ 洗脱缓冲液体积不应少于 30  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。