

HighPure Plasmid Mini Kit 高纯质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PL03

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PL.0301)	100 次 (PL.0302)	200 次 (PL.0303)
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
RNase A (10mg/ml)	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
去蛋白液 PE	室温	16 ml	32 ml	63 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇		
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	15 ml	20 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	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, 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°C 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。
3. 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°C 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。
4. 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进口世界著名公司特制吸附膜，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. 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，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 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，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 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。**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℃。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 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 1.5-4.5 ml 过夜培养的菌液，12,000rpm 离心 30 秒，尽可能的倒干上清，收集菌体。

收集超过 1.5 ml 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5ml 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. 用 250μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，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 250μl 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 350μl 溶液 P3，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。

12,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清。

加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

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. 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 秒，倒掉收集管中的废液。

6. **可选步骤**:加入 500 μ l 去蛋白液 PE，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。

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，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。

8. 加入 600 μ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

9. 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。

10. 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 50-100 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 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，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 30 μ l，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。