

高纯度质粒小提中量试剂盒

货号： NG211S 50次

NG211M 100次

适用范围：适用于5-15ml中等规模质粒制备（mind preparations）

试剂盒组成	保存	50次	100次
平衡液	室温	5ml	10ml
Rnase A (10mg/ml)	-20℃	250µl	500ul
溶液P1	4℃	25 ml	50ml
溶液P2	室温	25 ml	50ml
溶液P3	室温	35 ml	70ml
漂洗液PE	室温	25ml	50ml
漂洗液WB	室温	25 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇	50ml
洗脱缓冲液EB	室温	10ml	15ml
吸附柱AC	室温	50个	100个
收集管（2ml）	室温	50个	100个

储存事项:

- 第一次使用时，将试剂盒所带的全部RNase A加入溶液P1后置于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。
- 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。
- 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：

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
- 独有的漂洗液PE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。
- 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：

- 所有的离心步骤均在室温完成。
- 溶液P3和漂洗液PE中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 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，建议取5-15 ml 过夜培养14-16个小时的菌液，可提取出多达50µg-60µg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10-20 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。

- 4.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%。
- 5.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。
- 6.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 $^{\circ}$ C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100 μ l的平衡液至柱子中。12000 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 $^{\circ}$ C保存。将溶液P3放在冰上预冷。

- 1.取5-15 ml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500 μ l的溶液P2，温和地上下翻转4-7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700 μ l溶液P3，立即温和地上下翻转4-7次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。冰上静置3-5分钟，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。如果上清中还有白色沉淀，可再次离心后取上清。

平衡液预处理吸附柱：

- 5.将上一步所得上清分次加入吸附柱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漂洗液PE，12,000rpm离心30-60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100 μ l-250 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2-5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80 μ l，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。