

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2	保存条件
		50 RXN	200 RXN	
RNase A (10 mg/mL)	RM30107	125 µL	500 µL	-20°C
溶液 P1 (Buffer P1)	RM30103	12.5 mL	50 mL	4°C
柱平衡液 BL (Buffer BL)	RM30101	5 mL	20 mL	RT
吸附柱 SC2 (Spin Column 2)	RM30181	50 pk	200 pk	RT
收集管 2mL (Collection Tube 2mL)	RM30190	50 pk	200 pk	RT
溶液 P2 (Buffer P2)	RM30104	12.5 mL	50 mL	RT
溶液 P3 (Buffer P3)	RM30105	17.5 mL	70 mL	RT
去蛋白液 PR (Buffer PR)*	RM30109	16 mL	64 mL	RT
漂洗液 WB (Buffer WB)**	RM30110	13 mL	2 × 25 mL	RT
洗脱液 EB (Buffer EB)	RM30111	10 mL	20 mL	RT

*注: 50 RXN去蛋白液Buffer PR使用前加入10 mL无水乙醇, 200 RXN去蛋白液Buffer PR使用前加入40 mL无水乙醇。

**注: 50 RXN漂洗液Buffer WB使用前加入52 mL无水乙醇, 200 RXN漂洗液Buffer WB使用前每瓶各加入100 mL无水乙醇。

产品说明

本试剂盒采用改进的 SDS-碱裂解法去裂解细胞。柱内硅基质膜在高盐、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 PR 和漂洗液 WB 将杂质和其它细菌成分去除, 最后低盐、高 pH 值的洗脱液 EB 将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件、细胞的裂解情况、质粒的拷贝数、质粒的稳定性和抗生素等因素有关。

产品特点

1. 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, 有效防止质粒被核酸酶降解。
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。
3. 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。一般情况下, 高拷贝质粒接种单菌落于 1.5-4.5 mL 加合适抗生素的 LB 培养基, 过夜培养 12-16 个小时, 可提取出多达 20 µg 的纯净质粒。

保存条件

1. 本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。
2. RNase A 和 Buffer P1 可短期常温运输, RNase A 长期保存放 -20°C, Buffer P1 长期保存放 4°C。
3. 在 2-8°C 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在 37°C 水浴中预热 10 min 以溶解沉淀。试剂偶有颗粒不影响实验效果。

适用范围

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化、体外翻译等。

注意事项

1. 平衡液是强碱性溶液, 请注意适当防护, 避免直接接触人体。
2. 所有离心步骤均在室温进行, 使用转速 $\geq 12,000$ rpm ($\sim 13,400 \times g$) 的离心机。
3. 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 12-16 个小时, 可提取出多达 20 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, 所用菌量一般不能超过 10 mL (过量的细菌会导致后续的裂解不充分), 同时按比例增加溶液 P1、P2、P3 的用量, 其它步骤相同。
4. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA, 不影响下游酶切、连接等反应。可以使用水进行洗脱, 需确保洗脱用水的 pH 大于 7.5。DNA 只在低盐

溶液中才能被洗脱，洗脱效率还取决于 pH 值，最大洗脱效率在 pH 7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60°C 后使用，有利于提高洗脱效率。用水洗脱的质粒需保存在 -20°C。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10 mM Tris-HCl, 1 mM 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。

- 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可将试剂 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。
- 每次使用后应及时盖紧试剂瓶，以避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。

操作说明

实验前准备

- 首次使用时请按说明分别向去蛋白液 PR 和漂洗液 WB 中加入规定量的无水乙醇（用户自备），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！
- 首次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100 µg/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（或需另购或自备）。

实验步骤（请先阅读注意事项）

- 取 1.5-4.5 mL 过夜培养的菌液，12,000 rpm (~13,400 x g) 离心 30 秒，尽可能的倒干上清，收集菌体。
注：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。（对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过 5 mL，对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过 10 mL。过量的细菌会导致后续的裂解不充分）。
- 用 250 µL 溶液 P1（**请先检查是否已加入 RNase A!**）重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。
注：未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。如果没有涡旋器，可以用手指轻弹管底，把沉淀弹开。
- 加 250 µL 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。
注：温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！颠倒 6-8 次后，溶液应变得透明，无团块或絮状物。如果没有完全散开，或遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数 3-5 次，再室温放置 2-3 分钟，总裂解时间不可超过 5 分钟。
- 加 350 µL 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。12,000 rpm (~13,400 x g) 离心 10 分钟，小心取上清。
注：加入溶液 P3 后应立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。离心期间可进行步骤 5 柱平衡步骤。
- 柱平衡液预处理吸附柱 SC2：取一个新的吸附柱 SC2 装在收集管中，吸取 100 µL 的柱平衡液 Buffer BL 至柱子中。12,000 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。
- 将第 4 步所得上清加入吸附柱 SC2 中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (~13,400 x g) 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
注：此步骤目的为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 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。
- 加入 600 µL 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm (~13,400 x g) 离心 30 秒，弃掉废液。加入 600 µL 漂洗液 WB，12,000 rpm (~13,400 x g) 离心 30 秒，弃掉废液。
- 将吸附柱 SC2 放回空收集管中，12,000 rpm (~13,400 x g) 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。
- 取出吸附柱 SC2，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 50-100 µL 洗脱液 EB（为提高洗脱效率，洗脱液可预先在 65-70°C 水浴中加热），室温放置 2 分钟，12,000 rpm (~13,400 x g) 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，室温放置 2 分钟，12,000 rpm (~13,400 x g) 离心 1 分钟。
注：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，最小体积不应少于 30 µL，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。
- 将所得 DNA 洗脱液置于 -20°C 保存或直接用于后续实验。