

产品组分

组分名称	组分编号	规格 10 RXN	保存条件
RNase A (10 mg/mL)	RM30107	750 µL	-20 °C
内毒素清除剂 ER (Buffer ER)	RM30108	25 mL	-20 °C
溶液 P1 (Buffer P1)	RM30103	75 mL	4 °C
吸附柱 SC3 (Spin Column 3)	RM30182	10 pk	RT
收集管 50 mL (Collection Tube 50 mL)	RM30191	4 × 5 pk	RT
溶液 P2 (Buffer P2)	RM30104	75 mL	RT
溶液 N3 (Buffer N3)	RM30106	75 mL	RT
去蛋白液 PR (Buffer PR) *	RM30109	65 mL	RT
漂洗液 WB (Buffer WB) **	RM30110	2 × 25 mL	RT
洗脱液 EB (Buffer EB)	RM30111	20 mL	RT

*注: 10 RXN去蛋白液Buffer PR使用前加入38 mL无水乙醇。

**注: 10 RXN漂洗液Buffer WB使用前加入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。粗提物通过独特的内毒素清除剂选择性结合, 离心除去内毒素。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. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀。
3. 独特工艺配方清除内毒素, 内毒素含量极低 (<0.1 EU/µg DNA), 细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。
4. 快速、方便, 获得的质粒质量好。从 150-300 mL 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中, 可快速提取 0.5-2 mg 纯净的高拷贝质粒 DNA, 提取效率可达 80-90%。

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 和内毒素清除剂 Buffer ER 可短期常温运输, Buffer ER 可在 4°C放一个月, 长期保存放-20°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

可直接用于细胞转染实验, 以及酶切、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 8,000 rpm (~ 8,200 x g), 带 50 mL 转头的台式离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。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, 同时按比例增加溶液 P1、P2、N3 的用量, 其它步骤相同。

3. 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。
4. 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。
5. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶，以免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

1. 首次使用时请按说明分别向去蛋白液 Buffer PR 和漂洗液 Buffer 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！
2. 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）

1. 取 150-200 mL（最多不超过 300 mL）过夜培养的菌液，8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 1 min，尽可能地倒干上清，收集菌体。
注：收集超过 50 mL 菌液，可离心弃上清后，在同一个 50 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. 用 7.5 mL 溶液 P1（**请先检查是否已加入 RNase A!**）重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。
注：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 7.5 mL 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。
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 min，总裂解时间不可超过 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 7.5 mL 溶液 N3，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。8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 10-15 min，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮白色沉淀。
注：加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。注意切勿震荡，颠倒次数也不宜过多，否则易导致最终所得质粒的质量下降。
（步骤 5-7 为可选步骤，若后续实验对内毒素敏感，可按照步骤 5-7 进行操作以进一步提高内毒素去除效率。）
5. 加入 0.1 倍体积（上清的体积的 10%，约 2.4 mL）的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀，冰浴或者插入碎冰中（或冰箱冷冻室）放置 5 min 直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间偶尔混匀几次。
注：内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮（或稍浑浊）。
6. 常温放置 3-5 min，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。
注：如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42°C 水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
7. 室温 10,000 x g 离心 10 min 分相。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。
注：离心过程中温度需大于 25°C，温度过低，无法有效分层。如果发现不能有效的分层，可延长离心时间至 15 min。
8. 向上层水相中加入 0.5 倍体积异丙醇后充分颠倒混匀后分两次（每次不超过 10 mL，因个别情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 mL，以防产生漏液现象）转入吸附柱 SC3 中（吸附柱放入收集管中），8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，直到所有混合溶液通过此吸附柱。
9. （可选步骤）加入 10 mL 去蛋白液 PR（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 30 sec，弃废液。
注：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 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。
10. 加入 10 mL 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 30 sec，弃掉废液。再加入 10 mL 漂洗液 WB，

重复漂洗一次。

11. 将吸附柱 SC3 放回空收集管中, 8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 3 min, 打开盖子室温晾干 2-3 min, 以干燥基质膜上残留乙醇。该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇, 残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率, 降低质粒产量。
12. 取出吸附柱 SC3, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 1-2 mL 洗脱缓冲液 EB (为提高洗脱效率, Buffer EB 可预先在 65-70°C 水浴中加热), 室温放置 2 min, 8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 1-2 min。为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 1 min, 8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 1-2 min。
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 1 mL, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。
13. 将所得 DNA 洗脱液置于 -20°C 保存或直接用于后续实验。

DNA 浓度、纯度等测定

1. 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。
2. 质粒 DNA 确切分子大小必须经过酶切线性化后, 经琼脂糖凝胶电泳结果来判断。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。