

## 高纯度质粒小量提取试剂盒

货号： NG201S 100次  
NG201M 200次

试剂盒组成	保存	100次	200次
平衡液	室温	10ml	20ml
RNaseA (10mg/ml)	-20°C	250µl	500µl
溶液 S1	4°C	25 ml	50 ml
溶液 S2	室温	25 ml	50 ml
溶液 S3	室温	40 ml	80 ml
漂洗液 PE	室温	50ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	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	15ml	20ml
吸附柱 AC	室温	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 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 S1 后置于 2-8°C 保存。如果溶液 S1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 S1 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 S2 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。
- 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:

本品采用改进 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。
- 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，离心机转速需达到 12,000rpm。
- 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 20µg 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 S1、S2、S3 的用量，其它步骤相同。
- 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。OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50µg/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%。
- 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。
- 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°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（可选步骤）

- ⇨ 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°C 使沉淀完全消失。
- ⇨ 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。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 S1 中，混匀，每次使用后置于 2-8°C 保存。
- 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 1.5ml 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。
  - 用 250μl 溶液 S1 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。
  - 加 250μl 的溶液 S2，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。
  - 加 350μl 溶液 S3，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 S3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

**（可选步骤）平衡液预处理吸附柱：使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”**

- 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。
- 可选步骤：加入 500μl 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、Top10 和 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。
- 加入 600μl 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。
- 加入 600μl 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
- 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。
- 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 50-100μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70°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 30μl，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。