

版本号:181125

## HighYield Plasmid Mini Kit

### 高产量质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PL15

#### ❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PL1501)	100 次 (PL1502)
平衡液	室温	5ml	10ml
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	150µl	250µl
溶液 P1	4℃	15 ml	25 ml
溶液 P2	室温	15 ml	25 ml
溶液 N3	室温	15 ml	25 ml
漂洗液 WB	室温	31.5 ml	63 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
去蛋白液 PE	室温	15 ml	25 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	15ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 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. 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℃ 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。
2. 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。
3. 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：

本试剂盒采用独特的高产量 SDS-碱裂解法配方裂解细胞，质粒产量提高 1-2 倍。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. 特殊改进的高产量缓冲液配方可以把质粒产量提高 1-2 倍。
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。

## ❖ 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1.5-5 ml加合适抗生素的LB培养基，过夜培养14-16个小时**，可提取出高达30-50 $\mu$ 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、N3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。OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50 $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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℃ 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。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 250μl 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。12,000 rpm 离心 10 分钟，小心取上清至新管，避免吸收到漂浮白色沉淀。  
**加入溶液 N3 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. 向上清中加入 0.5 体积异丙醇（约 335 $\mu$ l）后充分颠倒混匀后分两次（每次不超过 700 $\mu$ l）转入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
6. **可选步骤：**加入 500 $\mu$ l 去蛋白液 PE，12,000 rpm 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 $\alpha$  等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。**
7. 加入 600 $\mu$ l 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。再加入 600 $\mu$ l 漂洗液 WB，重复漂洗一次。
8. 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。
9. 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 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟，12,000 rpm 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，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 $\mu$ l，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。**