

高纯度质粒小提试剂盒

货号: SB-NG201S 100 次

SB-NG201M 200 次

试剂盒组成	保存	100 次	200 次
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
		25ml	50ml
漂洗液 WB	室温	加 4 倍体积无水乙醇	
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 (终浓度 100ug/ml) 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:

- 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。
- 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 13,000rpm。
- 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。OD₂₆₀ 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。

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°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。

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 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 S1 中，混匀，每次使用后置于 2-8°C 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 1.5ml 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。
 2. 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。
 3. 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。
 4. 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。
 5. 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。
 6. 可选步骤:加入 500µl 去蛋白液 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。
 7. 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。
 8. 加入 600µl 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 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。