

## 快速质粒小量提取试剂盒

**KD401 50次**

### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
RNase A	-20°C	28μl
溶液 P1	4°C	14 ml
溶液 P2	室温	14 ml
中和液 P3	室温	20 ml
去蛋白液 PE	室温	25 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 TE	室温	6 ml
吸附柱 AC 和收集管 (2ml)	室温	50 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. RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输。收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放 - 20°C。
2. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出沉淀, 可在 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。
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 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 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

缓冲液将质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

### 产品特点：

1. 试剂盒快速，在 8 分钟内从 1~5 ml 细菌培养物（LB 培养基）中快速提取多至 50 g 高纯度的质粒。
2. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
3. 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

- ⇒ 第一次使用前请在去蛋白液 PE 中加入指定量无水乙醇，充分混匀。
  - ⇒ 第一次使用前向装有 RNase A 的螺旋盖管中加入 1 ml 溶液 P1，混匀后再将溶液吸回到装有溶液 P1 的瓶子中，并在标签的方框中打勾做好“RNase A 已加”的标记，置于 2~8℃保存
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。
  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1.5-4.5 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 P1、P2、P3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。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。

### 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

- ⇒ 第一次使用前请先在去蛋白液 PE 瓶中加入指定量无水乙醇, 充分混匀,
- ⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 P1 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 1.5 ml 菌液, 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 250 $\mu$ l 溶液 P1 (已经加 RNase A) 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 250 $\mu$ l 的溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。
  4. 加 350 $\mu$ l 溶液 P3, 立即温和并充分地翻转离心管直至溶液中残留的蓝色沉淀全部转变为淡黄色沉淀。此步骤不可用旋涡振荡器混匀, 否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。当使用的细菌量大于 3 ml, 或者已知细菌的浓度较高的前提下, 在蓝色沉淀完全转变为黄色沉淀后, 应继续温和地翻转 4-6 次, 或者翻转至沉淀物开始收缩, 变得松散为止。
  5. 13000rpm 离心 2 分钟。(当使用的细菌量大于 3 ml, 或者已知细菌的浓度较高的前提下, 离心 5 分钟)。
  6. 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 秒, 弃收集管中的废液。
  7. 加入 800 $\mu$ l 去蛋白液 PE (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
  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 (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 30 $\mu$ l, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。
  10. 质粒 DNA 可以存放在 2-8°C, 如果要长时间存放, 可以放置在 -20°C。