

公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！

商品属性：

产品名称	规格	货号
高纯质粒小提中量快速提取试剂盒	50 次	P-PR1022

保存条件：本产品收到后按照上面指示温度存放各成份，储存 18 个月不影响使用效果。

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 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

提取得率：

质粒类型	菌液量	得率	质粒
低拷贝	5-15ml	5-25ug	如：pBR322 pACYC PET 系列等
高拷贝	5-15ml	15-70ug	如：pMD18-T pUC19 等

产品特点：

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
- 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：

- 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 4°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。
- 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°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。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
- 溶液 P3 和去蛋白液 PD 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- 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 5ml-15ml 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 70μg 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，同时按比例增加 P1、P2、P3 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%。
- 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。

自备试剂：无水乙醇

操作步骤：

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 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8°C 保存。

□ 将溶液 P3 放在冰上预冷。

1. 可选步骤：向吸附柱 BC 中（吸附柱放入收集管中）加 500 μ l 平衡液 BL，12,000rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理柱子。）

2. 取 5-15 ml 过夜培养的菌液，12,000rpm 离心 1 min，尽可能倒干上清，收集菌体。

3. 用 500 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。

4. 加 500 μ l 的溶液 P2，温和地上下翻转 4-7 次使菌体充分裂解。

5. 加 700 μ l 溶液 P3，立即温和地上下翻转 4-7 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。12,000rpm 离心 10 min，小心取上清。

6. 将上一步所得上清分次加入吸附柱 BC 中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液。

7. 可加入 500 μ l 去蛋白液 PD，12,000rpm 离心 30-60 sec，弃废液。

8. 加入 500 μ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 sec，弃掉废液。

9. 重复步骤 8。

10. 将吸附柱 BC 放回空收集管中，12,000rpm 离心 2 min，将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱 BC，放入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位加 100 μ 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 min，12,000rpm 离心 1 min。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 min，将质粒溶液收集到离心管中。