高纯度质粒小提中量试剂盒

货号： SB-211S 50 次

SB-211M 100 次

适用范围：适用于 5-15ml 中等规模质粒制备（mind preparations）

试剂盒组成	保存	50 次	100 次
平衡液	室温	5ml	10ml
Rnase A	- 20℃	250μl	500ul
溶液 P1	4℃	25 ml	50ml
溶液 P2	室温	25 ml	50ml
溶液 P3	室温	35 ml	70ml
去蛋白液 PE	室温	25ml	50ml
漂洗液 WB	室温	25 ml	50ml
		第一次使用前加 4 倍体积无水乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml	15ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个
收集管（2ml）	室温	50 个	100 个

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。

产品特点：

1. 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。
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。
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

1. 所有的离心步骤均在室温完成。
2. 溶液 P3 和去蛋白液 PE 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。
3. 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，建议取 5-15 ml 过夜培养 14-16 个小时的菌液，可提取出多达 50μg-60μg 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 10-20 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。
4. 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_{260} 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%。
5. 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的质粒，

泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。

6. 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℃。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。13000 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 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃保存。将溶液 P3 放在冰上预冷。

1. 取 5-15 ml 过夜培养的菌液，9,000rpm 离心 1-2 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
2. 用 500μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮，全部转入一个 2ml 离心管。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 500μl 的溶液 P2，温和地上下翻转 4-7 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 700μl 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。冰上静置 3-5 分钟，13,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清。加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。如果上清中还有白色沉淀，可再次离心后取上清。

平衡液预处理吸附柱：

5. 将上一步所得上清分次加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中）， 13,000rpm 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，13,000rpm 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 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，13,000rpm 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 100μl-250 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置 2-5 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 80ul，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。