

Imagene[®]

Plasmid Mini Kit 质粒小量快速提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

Plasmid Mini Kit

质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PE101

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	5 次 (PE101-01)	100 次 (PE101-02)	200 次 (PE101-03)
		4 ml	40 ml	80 ml
平衡液 BS	室温	第一次使用前按说明加指定量异丙醇		
		(1.6 ml)	(16 ml)	(32 ml)
RNaseA (10mg/ml)	-20 °C	—	200 μl	400 μl
溶液 A	4 °C	3 ml	30 ml	60 ml
溶液 B	室温	3 ml	30 ml	60 ml
溶液 C	室温	3 ml	40 ml	80 ml
		1.5 ml	30 ml	2×30 ml
漂洗液 WB	室温	第一次使用前按说明加指定量乙醇		
		(6 ml)	(120 ml)	(120 ml/瓶)
洗脱缓冲液 EB	室温	1.5 ml	15 ml	30 ml
吸附柱 AD	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 CT (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

特别提醒: 试剂盒使用时请提前准备无水乙醇和异丙醇。

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 A 后, 置于 2-8°C 保存。如果溶液 A 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在溶液 A 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 B 和溶液 C 中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, 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。
2. 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. 本试剂盒适用菌株为XL-1 Blue、Top10和DH5α等核酸酶含量低缺陷型菌株。**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，应购买本公司生产的高纯度质粒小量快速提取试剂盒（PE102）。**
2. 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。
3. 溶液C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。**
4. 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A、B、C的用量，其它步骤相同。
5. 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%。**
6. **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。

7. **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。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

提示：

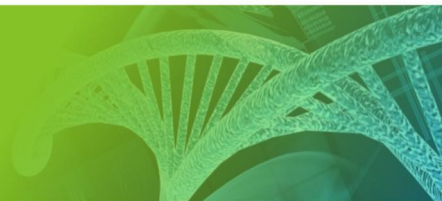
- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记，以免多次加入！
- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 BS 瓶中加入指定量异丙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记，以免多次加入！
- ⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 A 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃ 保存。

1. 将带有质粒的 E.coli 接种于 5 mL LB/抗生素培养液中，37℃ 摇床培养 12~16 h。
2. 取 1.0~5.0 mL 的菌液，室温下 10,000rpm 离心 1 min，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 1.5 ml 管内加入更多的菌液，重复步骤，直到收集到足够的菌体。

3. 加入 250 μl 溶液 A/RNaseA 混合液，漩涡振荡使菌体完全悬浮。
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。
4. 往重悬混合液中加入 250 μl 溶液 B，轻轻颠倒混匀 6-8 次使菌体充分裂解。
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。
5. 加入 350 μl 溶液 C，立即轻轻颠倒混匀 6-8，充分混匀至出现白色絮状沉淀。
13,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清。
加入溶液 C 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
6. 将上一步所得上清加入吸附柱 AD 中（吸附柱 AD 放入收集管 CT 中），13,000rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管 CT 中的废液。

7. 把柱子重新装回收集管，加入 500 μ l 平衡液 BS（**请先检查是否已加入异丙醇!**），室温下 13,000rpm 离心 1 分钟，弃去废液。
8. 加入 700 μ l 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000rpm 离心 1 分钟，弃掉废液。
9. 加入 700 μ l 漂洗液 WB，13,000rpm 离心 1 分钟，弃掉废液。
10. 将吸附柱 AD 放回空收集管 CT 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。
11. 取出吸附柱 AD，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 30-100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液使用前在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，13,000rpm 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 μ l，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。
12. 将洗脱的 DNA 保存在-20 $^{\circ}$ C。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com