



质粒小提中量提取试剂盒

(Plasmid Midiprep Kit)

目录号: ZP103

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP103-01 (50 次)	ZP103-02 (100 次)	ZP103-03 (200 次)
RNaseA (10 mg/ml)	300 μ l	600 μ l	1.2 ml
溶液 1	30 ml	60 ml	120 ml
溶液 2	30 ml	60 ml	120 ml
溶液 3	40 ml	80 ml	150 ml
去蛋白液 W1	30 ml	60 ml	120 ml
漂洗液 W2	15 ml	2 \times 15 ml	2 \times 30 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml	30 ml
吸附柱	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

储存条件:

本试剂盒在室温 (15–25℃) 干燥条件下, 可保存 1 年; 更长时间的保存可置于 2–8℃。2–8℃保存条件下, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37℃下溶解沉淀。单独包装的 RNase A 在-20℃可稳定保存 1 年以上。加入 RNase A 后的溶液 1 应置于 2–8℃保存, 可稳定保存半年。

产品简介:

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞, 通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料, 高效、专一吸附DNA, 可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。从5–15 ml 大肠杆菌LB(Luria–Bertani)培养液中, 可快速提取多至70 μ g纯净的高拷贝质粒DNA, 提取率达85–90 %。

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 按 1 : 100 的比例向溶液 1 中加入 RNaseA, 混匀, 置于 2–8℃保存。
- 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液 W2 中加入无水乙醇。
- 使用前先检查溶液 2 和溶液 3 是否出现浑浊, 如有混浊现象, 可在 37℃水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清。
- 注意不要直接接触溶液 2 和溶液 3, 使用后应立即盖紧盖子。
- 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心, 速度为 12,000 rpm (~13,400 \times g)。
- 提取的质粒质量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒, 应加大菌体使用量, 同时按比例增加溶液 1、2、3 的用量, 洗脱缓冲液应在 65–70℃预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间, 以增加提取效率。
- 去蛋白液 W1 可以有效去除残留的蛋白杂质, 当宿主菌为 endA⁺ (TG1、BL21、HB101、ET1256、JM101 等) 核酸酶含量较高的菌株时, 强烈推荐去蛋白液 W1。
- 去蛋白液 W1 可能会影响实验得率, 因此如果宿主菌非上述提及的名称, 可省略此步骤。

操作步骤：

1. 取 5–15 ml 过夜培养的菌液加入离心管中，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟，尽量吸除上清。
注意：菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中。收集的菌体量以能够充分裂解为佳，菌体过多裂解不充分会降低质粒的提取效率。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μl 溶液 1 (请先检查是否已加入 RNaseA)，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。
注意：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. 向离心管中加入 500 μl 溶液 2，温和地上下翻转 6–8 次使菌体充分裂解。
注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过 5 分钟，以免质粒受到破坏。如果菌液没有变清亮，可能是由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
4. 向离心管中加入 700 μl 溶液 3，立即温和地上下翻转 6–8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。12,000 rpm (~13,400×g) 离心 10 分钟，此时在离心管底部形成沉淀。
注意：溶液 3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
5. 将上一步收集的上清液分次加入吸附柱中 (吸附柱放入收集管中，其容量为 750–800 μl)，注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。
6. 可选步骤：向吸附柱中加入 500 μl 去蛋白液 W1，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
如果宿主菌是 *end A⁺* 宿主菌 (*TG1*，*BL21*，*HB101*，*JM101*，*ET12567* 等)，这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒 DNA，推荐采用此步。
此步骤可能会影响质粒的得率，如果宿主菌是 *endA*-宿主菌 (*DH5α*，*TOP10* 等)，这步可省略。

7. 向吸附柱中加入 700 μl 漂洗液 W2 (请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。重复此步骤一次。
8. 吸附柱放入收集管中，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。
注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱开盖，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。
9. 将吸附柱置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 100–300 μl 洗脱缓冲液 TE，室温放置 2–5 分钟，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。
注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，重复步骤 9。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液，应保证其 pH 值在 7.0–8.5 范围内 (可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液体积不应少于 100 μl，体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

质粒 DNA 浓度及纯度检测

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。电泳可能为单一条带，也可能为 2 到 3 条 DNA 条带，这主要与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7–1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，但并不表示纯度低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值。