

Plasmid Miniprep Kit

REF: EG23702S

储运条件

RNase A : -30~-15°C保存, 蓝冰运输;

其他组分: 15~25°C保存, 室温运输。

产品组成

组分	规格 (100 rxns)
RNaseA (10 mg/ml)	300 µl
Buffer B	10 ml
Buffer P1	30 ml
Buffer P2	30 ml
Buffer P3	40 ml
Buffer PW	31.5 ml
Buffer WB	2×15 ml
Buffer EB	15 ml
Adsorption columns AC & Collection Tubes (2 ml)	2×50 套

RNase A: 酶解样品中的 RNA;

Buffer B: 平衡液;

Buffer P1: 细菌悬浮液。第一次使用前将 RNase A 加入 Buffer P1 中;

Buffer P2: 细菌裂解液 (含 SDS/NaOH);

Buffer P3: 中和液;

Buffer PW: 去除质粒中的蛋白等杂质;

Buffer WB: 去除质粒中的盐离子残留;

Buffer EB: 洗脱液;

Adsorption columns AC & Collection Tubes: 吸附柱 AC & 滤液收集管。

产品简介

本产品采用改进的 SDS- 碱裂解法裂解细胞, 离心吸附柱内的硅胶膜在高盐、低 pH 条件下高效特异结合裂解液中的质粒 DNA, 再通过去蛋白液和漂洗液将蛋白质、基因组 DNA、RNA 和其他杂质去除, 最后使用低盐、高 pH 的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。本产品不使用毒性较大的苯酚、氯仿等试剂, 每个吸附柱可吸附高达 20 µg 的质粒 DNA。纯化的质粒 DNA 可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等分子生物学实验。

自备材料

1.5 ml 灭菌离心管, 无水乙醇。

注意事项

1. 首次使用前请短暂离心 RNase A, 将试剂盒提供的 RNase A 溶液全部加入 Buffer P1 中 (终浓度 100 µg/ml), 加入后请及时打勾标记, 避免多次加入, 混匀后置于 2~8°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 酶活降低, 提取的质粒会有微量 RNA 残留, 向溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

2. 首次使用前按 Buffer WB 和 Buffer PW 瓶身标签所示, 加入指定量无水乙醇, 加入后请及时打勾标记, 避免多次加入, 混匀后于室温保存。

3. 环境温度较低时, Buffer P2、Buffer B 可能有沉淀产生, 使用前可在 37°C 下预热至沉淀完全溶解, 混匀后再使用, 不要剧烈摇晃。

4. Buffer PW 可以去除痕量核酸酶等杂质, 如果宿主菌为 endA+ (TG1、BL21、HB101、ET12567、JM 系列等) 等核酸酶含量较高的菌株时, 必须使用 Buffer PW; 如果宿主为 endA- (XL-1 Blue、TOP10、DH5α 等) 等核酸酶含量低的菌株时, 可以省略 Buffer PW。

5. 质粒提取得率和质量与宿主菌种类、质粒拷贝数、质粒大小及质粒稳定性等因素有关。若需要提高质粒提取得率, 推荐使用 Buffer B 先平衡吸附柱。

6. 如果提取低拷贝质粒或者 >10 kb 的大质粒时, 应适当加大菌体使用量, 使用 6~10 ml 菌液, 同时需加倍 Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer P3 的用量, 其它步骤相同。

7. Buffer 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 ddH₂O 洗脱, 并确保 ddH₂O 的 pH 在 7.0~8.5 范围内, pH 低于 7.0 会降低洗脱效率。

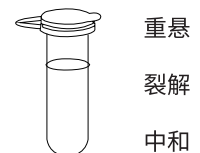
8. 质粒 DNA 确切的分子大小, 必须酶切线性化后, 对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒, 泳动位置不确定, 无法通过电泳知其确切大小。

9. 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。

10. 注意不要直接接触 Buffer B、Buffer P2、Buffer P3 和 Buffer PW, 使用应戴手套。

实验原理与流程概要

加入 250 µl Buffer P1
加入 250 µl Buffer P2
加入 350 µl Buffer P3

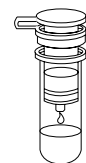


重悬

裂解

中和

加入 500 µl Buffer PW (可选)
加入 600 µl Buffer WB
加入 600 µl Buffer WB



结合

洗涤

加入 50~100 µl Buffer EB 或去离子水



洗脱

实验流程

1. 取 1.5~5 ml 过夜培养 (12~16 h) 的菌液, 加入离心管中 (自备), 12000 rpm 离心 1 min。弃培养基, 倒扣于吸水纸上吸尽残液。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ l Buffer P1 (请先检查 Buffer P1 是否已经加入 RNase A) 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至看不到细菌团块。
注: 若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. 向步骤 2 中加入 250 μ l Buffer P2, 温和的上下颠倒混匀 6~8 次, 使菌体充分裂解。
注: 轻轻颠倒混匀, 切勿涡旋, 否则会引起基因组 DNA 断裂, 造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。如果溶液变得粘稠而透亮, 表明细菌已充分裂解。若溶液未变清亮, 可能由于菌体过多导致裂解不彻底, 应当适当减少菌体量。操作时间不要超过 5 min, 以免质粒受到破坏。
4. 向步骤 3 中加入 350 μ l Buffer P3, 立即温和地上下颠倒 8~10 次, 充分混匀时会出现白色絮状沉淀。13000 rpm 离心 10 min, 小心取上清。
注: Buffer P3 加入后应立即颠倒混匀, 以防止 SDS 产生局部沉淀而影响中和效果。若上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。
5. (可选) 将吸附柱置于收集管中, 加入 100 μ l Buffer B 至吸附柱膜上。12000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
注: 如果吸附柱放置时间过长、暴露于空气时间过久或者回收率偏低时, 推荐采用此步。Buffer B 处理过的柱子应当天使用, 放置时间过长会影响效果。
6. 将步骤 4 上清用移液器小心转移至吸附柱中, 注意不要吸到沉淀, 12000 rpm 离心 30~60 s。弃废液, 把吸附柱重新放回收集管中。
7. (可选) 加入 500 μ l Buffer PW (请检查是否已加入无水乙醇) 至吸附柱中。12000 rpm 离心 30~60 s。弃废液, 把吸附柱重新放回收集管中。
注 1: 如果宿主菌是 endA+ 基因型 (TG1, BL21, HB101, JM 系列, 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。
注 2: 如果宿主菌是 endA- 基因型 (DH5 α , TOP10 等), 此步可省略。
8. 加入 600 μ l Buffer WB (请检查是否已加入无水乙醇) 至吸附柱中。12000 rpm 离心 30~60 s。弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
9. 重复步骤 8。
10. 将吸附柱放回收集管后, 12000 rpm 离心 2 min, 尽量去除吸附柱中残留的 Buffer WB。
注: Buffer WB 中的乙醇残留会影响下游的酶反应, 如酶切、酶链、PCR 等。此步骤不可省略。
11. 将吸附柱置于一个新的无菌 1.5 ml 离心管中。在吸附膜的中间部位加入 50~100 μ l Buffer EB。室温静置 2 min, 12000 rpm 离心 1 min 洗脱 DNA。
注: 洗脱体积不应少于 30 μ l, 低于 30 μ l 会导致洗脱效率下降。若需要获得最高产量, 将洗脱缓冲液 EB 预热至 65~70 $^{\circ}$ C 提高洗脱效率。此外可将离心得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 重复步骤 10 进行二次洗脱。若后续做测序需使用 ddH₂O 洗脱, 并确保 ddH₂O 的 pH 在 7.0~8.5 范围内, pH 低于 7.0 会降低洗脱效率。
12. 弃去吸附柱, 将质粒 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C, 以防止降解。