上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

质粒中量抽提试剂盒(通用型)

产品编号	产品名称	包装
R33170-50T	质粒中量抽提试剂盒(通用型)	50T

产品简介：

源叶的质粒中量抽提试剂盒(通用型) (Plasmid Midi Preparation Kit for All Purpose, Plasmid Midiprep Kit for All Prupose)是一种用于从大肠杆菌中进行中量质粒快速抽提的通用型离心柱式试剂盒。

本试剂盒不仅适用于常用的 EndA- 菌株 DH5α、JM109 和 XL-1 blue 等，也适用于 EndA+ 菌株如 JM110、BL21(DE3)、TG1 和 HB101 等，能有效避免 EndA+ 菌株中高丰度核酸酶的污染，并适用于从糖类修饰水平高的野生菌株中提取质粒。

野生型大肠杆菌中表达 Endonuclease I，能切割并降解双链 DNA。编码 Endonuclease I 的基因是 endA，如果 endA 突变失活，其基因型会被标注为 endA1，相应的突变菌株被称为 EndA- 菌株，而野生型菌株则被称为 EndA+ 菌株。常见的 EndA- 和 EndA+菌株参见附表 1。从 EndA+ 菌株中抽提的质粒，微量核酸酶和质粒结合而容易被共纯化，导致容易降解，而本试剂盒增加了 特殊的洗涤步骤(核酸酶洗涤液溶液 PB 洗涤)，可以有效避免 EndA+ 菌株中抽提获得的质粒容易降解的问题(参考图 1)。

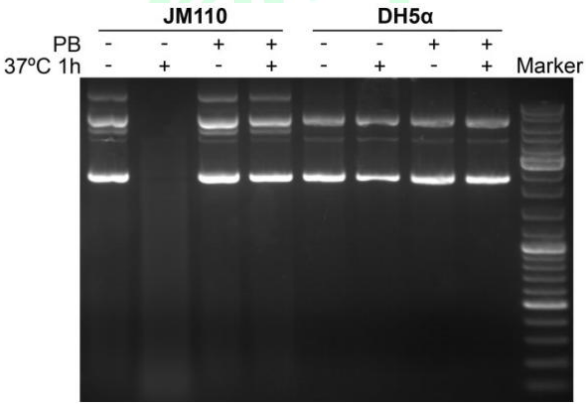

图 1. 使用溶液 PB 可以使从 EndA+ 菌株 JM110 中抽提的质粒不易降解，而对于 EndA- 菌株 DH5α 中抽提的质粒没有影响。使用本试剂盒时，如上图所示，在使用和不使用溶液 PB 时的质粒得率一致。但对于 EndA+ 菌株 JM110，不使用溶液 PB 时从其中抽提获得的

质粒在内切酶缓冲液 Buffer Y 中 37°C 孵育 1 小时后会全部降解，而使用溶液 PB 时同样孵育 1 小时就不会降解。对于 EndA- 菌株 DH5α 无论是否使用溶液 PB，抽提获得的质粒的都很稳定。

本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱。在特定条件下，使质粒能在离心过柱的瞬间，结合到质粒纯化柱上，在一定条件下又能将质粒充分洗脱，从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提，无需酒精沉淀，12 个样品只需不足 60 分钟即可完成。

无需高速冷冻离心机，只需普通台式高速离心机。所有操作均可在 1.5ml 离心管中完成。

每个质粒纯化柱可以结合的质粒量的上限约为 50 微克。每个纯化柱可用于抽提 5-10 毫升用 LB 培养过夜的大肠杆菌。抽提所得质粒的 OD260 和 OD280 比值一般在 1.80 左右。抽提获得的质粒量会受质粒拷贝数等因素影响。抽提获得的质粒 DNA 的 OD260 和 OD280 比值也会因菌种不同等原因而略有波动。

本试剂盒抽提所得到的质粒可直接用于转染细胞，DNA 测序，PCR，基于 PCR 的突变，体外转录，转化细菌，内切酶消化等。本试剂盒在使用溶液 PB 的情况下，获得的质粒的纯度更高，内毒素含量低，总体上转染细胞的效率会显著提高。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
R33170-50T	溶液 I (悬浮液)	45ml
	溶液 II (裂解液)	45ml
	溶液 III (结合液)	60ml
	溶液 PB (核酸酶洗涤液)	30ml
	溶液 IV (洗涤液)	18ml (第一次使用前加入 27ml 无水乙醇)
	溶液 V (洗脱液)	8ml
	RNase A (100mg/ml)	45μl
	中抽质粒纯化柱及废液收集管	50 套
——	说明书	一份

保存条件：

室温保存，一年有效。

注意事项：

第一次使用前把试剂盒提供的 RNase A 全部加到溶液 I (悬浮液)中，混匀，并在瓶上做好标记。加入 RNase A 后 4ºC 存放。

第一次使用前在溶液 IV (洗涤液)中加入 27ml 无水乙醇，混匀，并在瓶上做好标记。

温度较低时，溶液 II 和溶液 III 可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀，37ºC 水浴加热溶解，混匀后使用。溶液 II 请勿过分剧烈混匀，否则会产生大量气泡。

溶液 II 使用完后，一定要盖紧瓶盖，防止被空气中二氧化碳酸化。

溶液 II 有强碱性，溶液 II、溶液 III、溶液 PB 和溶液 IV 对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。

本试剂盒所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。

废液收集管在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。

本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 取过夜菌至 3 个 1.5 毫升离心管中，5000g 离心 1 分钟收集细菌沉淀，弃上清。再重复一次，每管共收集 3 毫升过夜菌沉淀。

通常大肠杆菌宜用 LB 培养过夜(16 小时左右)至 OD 值为 2-4。建议 5000g(通常为 5000rpm 左右)室温离心 1 分钟，如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密，不利于加入溶液 I 后散开沉淀。直接倒掉上清，再倒入约 1.5 毫升菌液并重复上述操作，然后倒置于吸水纸上(可用普通草纸)，使液体流尽。如果细菌密度明显偏低，可考虑使用更多菌液，再重复上述操作 1-2 次。对于高拷贝质粒所用菌量每管一般不能超过 5 毫升，对于低拷贝质粒所用菌量每管一般不能超过 10 毫升。过量的细菌会导致后续的裂解不充分。

2. 每管加入 250 微升溶液 I，重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开，无可见细菌团块。

确认溶液 I 中已经添加了 RNase A。最高速度 vortex 5-10 秒或更长时间，悬起沉淀。一定要充分混匀，对着光亮处观察应呈均匀的悬浊液，无明显细菌团块或絮块。如果没有 vortex，可以用枪吹打沉淀使沉淀逐渐散开或用手指把沉淀弹开。

3. 每管加入 250 微升溶液 II，轻轻颠倒离心管 4-6 次，使细菌完全裂解，溶液透明。

切勿 vortex！vortex 或其它剧烈操作会导致基因组 DNA 断裂，易导致最终所得质粒被基因组 DNA 污染。颠倒 4-6 次后，溶液应变得透明，无团块或絮状物。如果加入溶液 I 后细菌没有完全散开，那么颠倒 4-6 次后，可能还会有团块或絮状物。遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数 3-5 次，再室温放置 2-3 分钟，但总裂解时间不可超过 5 分钟。

4. 每管加入 350 微升溶液 III，随即颠倒离心管 4-6 次混匀，可见白色絮状物产生。

切勿 vortex！颠倒次数也不宜过多，否则易导致最终所得质粒的质量下降。

5. 最高速(13,000rpm 左右)室温离心 10 分钟。

离心后会产生白色沉淀。离心时准备好下一步需使用的质粒纯化柱，废液收集管，并在纯化柱上做好标记。

6. 将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。最高速离心 30-60 秒，倒弃收集管内液体。再重复两次，使三管质粒结合于同一纯化柱上。

质粒倒入质粒纯化柱后，可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。

7. (可选做)在质粒纯化柱内加入 500 微升溶液 PB，最高速离心 30-60 秒，洗去核酸酶污染等杂质，倒弃收集管内液体。

本步骤对于从 EndA+ 菌株如 JM110、BL21(DE3)、TG1 和 HB101 等中提取质粒并去除核酸酶污染是必须的，对于从其它任何具有较高核酸酶表达水平和

糖类修饰水平的菌株中提取质粒也是非常必须的。参考图 1，对于一些常用的 EndA- 菌株如 DH5α和 XL-1 blue 等如果后续仅用于酶切、PCR、反转录等常规分子生物学操作，并不需要本步骤。如果抽提获得的质粒用于细胞转染，宜增加本步骤。

8. 在质粒纯化柱内加入 750 微升溶液 IV，最高速离心 30-60 秒，洗去杂质，倒弃收集管内液体。

加入溶液 IV 后可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。

9. 最高速离心 1 分钟，除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。

注意：倒弃收集管内液体后再离心，才能彻底去除微量的溶液 IV。微量的溶液 IV 会影响质粒的质量。

10. 将质粒纯化柱置于洁净 1.5 毫升离心管上，加入 120 微升溶液 V 至管内柱面上，放置 1 分钟。

溶液 V 需要直接加至管内柱面中央，使液体被纯化柱吸收。如果不慎将溶液 V 沾在管壁上，一定要震动离心管，使液体滑落到管底，以便被纯化柱吸收。也可以用重蒸水或 Milli-Q 级纯水替代溶液 V，但是水的 pH 应不小于 6.5。溶液 V 加入后放置时间稍长，对于增加质粒产量会略有帮助。

11. 最高速离心 1 分钟，所得液体即为高纯度质粒。

通常所得质粒浓度为 0.1-0.3mg/ml 左右。如果想得到高浓度的质粒，可以采用常规的乙醇沉淀方法浓缩质粒。