产品组分

组分名称	组分编号	规格 50 RXN	保存条件
RNase A (10 mg/mL)	RM30107	125 μL	4°C
Buffer ER	RM30108	5 mL	4°C
Buffer P1	RM30103	12.5 mL	4°C
Buffer BL	RM30101	5 mL	RT
Spin Column 2	RM30181	50 pk	RT
Collection Tube 2 mL	RM30190	50 pk	RT
Buffer P2	RM30104	12.5 mL	RT
Buffer N3	RM30106	12.5 mL	RT
Buffer PR *	RM30109	16 mL	RT
Buffer WB **	RM30110	13 mL	RT
Buffer EB	RM30111	10 mL	RT

*注：50 RXN去蛋白液Buffer PR使用前加入10 mL无水乙醇。

**注：50 RXN漂洗液Buffer WB使用前加入52 mL无水乙醇。

产品说明

本试剂盒采用改进的 SDS-碱裂解法裂解细胞，通过独特的内毒素清除剂 Buffer ER 选择性结合离心除去内毒素。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 Buffer PR 和 Buffer WB 将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的 Buffer EB 将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒的拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

产品特点

1. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也无需乙醇沉淀。
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，有效防止质粒被核酸酶降解。
3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低（<0.1 EU/μg DNA），可直接用于细胞转染以及酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。
4. 快速、方便，获得的质粒产量高、纯度好。一般情况下，高拷贝质粒接种单菌落于 1.5-4.5 mL 加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 12-16 个小时，可提取出多达 20-50 μg 的纯净质粒。

保存条件

1. 本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。
2. Buffer ER 可短期常温运输，4°C 可以保存 12 个月。
3. RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中，25°C 室温可至少保存 6 个月，4°C 保存 12 个月，长期保存放置-20°C。
4. Buffer P1 加入 RNase A 后需 2～8°C保存，尽快在 3 个月内使用完。
5. 在 2-8°C保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C水浴中预热 10 min 以溶解沉淀。试剂偶有颗粒不影响实验效果。

注意事项

1. 平衡液是强碱性溶液，请注意适当防护，避免直接接触人体。
2. 所有离心步骤均在室温进行，使用转速≥12,000 rpm(～13,400 x g)的离心机。
3. 提取质粒的量与细菌培养浓度、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 10 kb 的大质粒，应适当加大菌体使用量，

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126
For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

所用菌量一般不能超过 10 mL（过量的细菌会导致后续的裂解不充分），同时按比例增加溶液 P1、P2、N3 的用量，其它步骤相同。

4. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。可以使用水进行洗脱，需确保洗脱用水的 pH 大于 7.5。DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，洗脱效率还取决于 pH 值，最大洗脱效率在 pH 7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60℃后使用，有利于提高洗脱效率。用水洗脱的质粒需保存在-20℃。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10 mM Tris-HCl，1 mM 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。
5. 环境温度低时 Buffer P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可将试剂 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。
6. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶，以免避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。

操作说明

实验前准备

1. 首次使用时请按说明分别向去蛋白液 PR 和漂洗液 WB 中加入规定量的无水乙醇（用户自备），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！
2. 首次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100 μg/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（ABclonal，RM29870）。

实验步骤（请先阅读注意事项）

1. 柱平衡液处理吸附柱：取一个新的吸附柱 Spin Column 2 装在 Collection Tube 2 mL 收集管中，吸取 100 μL 的柱平衡液 Buffer BL 至柱子中。12,000 rpm(~ 13,400 x g)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。

   注：平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。
2. 取 1.5-5 mL 过夜培养的菌液，12,000 rpm(~ 13,400 x g)离心 30 sec，尽可能的倒干上清，收集菌体。

   注：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 1，直到收集到足够的菌体。（对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过 5 mL，对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过 10 mL。过量的细菌会导致后续的裂解不充分）。
3. 用 250 μL Buffer P1（**请先检查是否已加入 RNase A！**）重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。

   注：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. 加 250 μL 的 Buffer P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 min。

   注：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 min，以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
5. 加 250 μL Buffer N3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。12,000 rpm（ ~ 13,400 x g）离心 10 min，小心取出上清至新管，避免吸取到漂浮的白色沉淀。

   注：加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
6. 加入 0.1 倍体积（上清的体积的 10%，约 75 μL）的 Buffer ER 到上一步所得上清，颠倒旋转混匀。

步骤 7-9 为可选步骤，如果提取的质粒下游需要转染至原代培养细胞等比较脆弱的细胞系，可按照以下步骤进一步彻底清除内毒素，达到最佳转染效果。

7. 将加入 0.1 倍体积（上清的体积的 10%，约 75 μL）的 Buffer ER 混匀后的上清，冰浴（或放入冰箱冷冻室）5 min 直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间可以充分颠倒混匀 1 次。

   注：内毒素清除剂 Buffer ER 加入上清后，可能会短暂浑浊，但是冰浴后应恢复清亮（或稍浑浊）。
8. 常温放置 3-5 min，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。

   注：如室内温度较低或想加快速度可以在 37-42℃ 水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
9. 室温 12,000 rpm 离心 10 min 分相。上层水相含质粒 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。

   注：离心过程中温度需大于 25℃，温度过低，无法有效分层。如果发现不能有效的分层，可延长离心时间至 15 min。
10. 向上清中加入 0.5 倍体积异丙醇（约 370 μL），充分颠倒混匀，分多次（每次不超过 700 μL）转入吸附柱 Spin Column 2 中（吸附柱

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126
For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

放入收集管中），12,000 rpm(~13,400 x g)离心 1 min，弃滤液。

11.（可选步骤）加入 500 μL Buffer PR（**请先检查是否已加入无水乙醇！**），12,000 rpm（~13,400 x g）离心 30 sec，弃滤液。

注：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、Top10 和 DH5α等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

12.加入 600 μL Buffer WB（**请先检查是否已加入无水乙醇！**），12,000 rpm（~13,400 x g）离心 30 sec，弃滤液。再加入 600 μL Buffer WB，重复漂洗一次。

13.将吸附柱 Spin Column 2 放回空收集管中，12,000 rpm(~13,400 x g)离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

14.取出吸附柱 Spin Column 2，放入一个干净的离心管（自备）中，在**吸附膜的中间部位**加 50-100 μL Buffer EB（为提高洗脱效率，Buffer EB 可预先在 80-90℃水浴中加热），室温放置 2 min，12,000 rpm（~13,400 x g）离心 1 min。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 min。

注：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，最小体积不应少于 30 μL，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

DNA浓度、纯度等测定

1. 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 50 μg/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。
2. 质粒 DNA 确切分子大小必须经过酶切线性化后，经琼脂糖凝胶电泳结果来判断。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。

E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126
For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.