产品组分

组分名称	组分编号	规格 10 RXN	保存条件
RNase A （10 mg/mL）	RM30107	750 μL	4°C
内毒素清除剂 ER（Buffer ER）	RM30108	25 mL	4°C
溶液 P1（Buffer P1）	RM30103	75 mL	4°C
溶液 P2（Buffer P2）	RM30104	75 mL	RT
溶液 N3（Buffer N3）	RM30106	75 mL	RT
吸附柱 SC3（Spin Column 3）	RM30182	10 pk	RT
收集管 50 mL（Collection Tube 50 mL）	RM30191	4 × 5 pk	RT
去蛋白液 PR（Buffer PR）*	RM30109	65 mL	RT
漂洗液 WB（Buffer WB）**	RM30110	2 × 25 mL	RT
洗脱液 EB（Buffer EB）	RM30111	20 mL	RT

*注：10 RXN去蛋白液Buffer PR使用前加入38 mL无水乙醇。

**注：10 RXN漂洗液Buffer WB使用前每瓶各加入100 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，独特的内毒素清除剂选择性结合内毒素并通过离心去除。柱内硅基质膜在高盐、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 PR 和漂洗液 WB 将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱液 EB 将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品特点

1. 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。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低（<0.1 EU/μg DNA），细胞转染效果极佳，也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。
4. 快速、方便，获得的质粒质量好。从 150-300 mL 大肠杆菌 LB（Luria-Bertani）培养液中，可快速提取 0.5-2 mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取效率可达 80-90%。

保存条件

1. Buffer ER 可短期常温运输，4°C 可以保存 12 个月，长期保存放置-20°C；
2. 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；
3. Buffer P1 加入 RNase A 后需 2～8°C保存，尽快在 3 个月内使用完；
4. 其他试剂可常温储存。

注意事项

1. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 8,000 rpm（～8,200 x g），带 50 mL 转头的台式离心机。
2. 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，同时按比例增加溶液 P1、P2、N3 的用量，洗脱液 EB（Buffer EB）应在 70°C 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
3. 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 65-75°C 后使用，有利于提高洗脱效率。用水洗脱的质粒需保存在-20°C。

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 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

4. 环境温度低时溶液 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。
5. 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 Buffer PR 和漂洗液 Buffer 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. 取 150-200 mL（最多不超过 300 mL）过夜培养的菌液，8,000 rpm（~8,200 x g）离心 1 min，尽可能地倒干上清，收集菌体。

   注：如使用 50 mL 离心管，可以离心弃上清后，在同一个 50 mL 离心管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
2. 使用 7.5 mL 溶液 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。
3. 加入 7.5 mL 溶液 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。
4. 加入 7.5 mL 溶液 N3，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。8,000 rpm（~8,200 x g）离心 10-15 min，小心取上清至新管，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。注意切勿震荡，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。如有漂浮白色沉淀，可用吸头撇开浮沫伸入液面下吸取，偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果，后续过滤漂洗过程中都会去除。
5. 加入 0.1 倍体积（上清体积的 10%，约 2.4 mL）的内毒素清除剂 Buffer ER 到上一步所得上清，颠倒旋转混匀。

步骤 6-8 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。

6. 将加入内毒素清除剂 Buffer ER 混匀后的上清冰浴或者插入碎冰中（或冰箱冷冻室）放置 5 min 直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间偶尔混匀几次。

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

   注：如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42℃水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
8. 室温 8,000 rpm（~8,200 x g）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。
9. 加入 0.5 倍体积异丙醇后充分颠倒混匀，分多次（每次不超过 10 mL）转入吸附柱 SC3 中（吸附柱放入收集管中），8,000 rpm（~8,200 x g）离心 1 min，倒掉收集管中的废液，直到所有混合溶液通过此吸附柱。

   注：个别情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 mL，以防产生漏液现象。
10. （可选步骤）加入 10 mL 去蛋白液 PR（**请先检查是否已加入无水乙醇！**），8,000 rpm（~8,200 x g）离心 1 min，弃废液。

    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。
11. 加入 10 mL 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇！**），8,000 rpm（~8,200 x g）离心 1 min，弃掉废液。再加入 10 mL 漂洗液 WB，重复漂洗一次，弃滤液。

12.将吸附柱 SC3 放回空收集管中，8,000 rpm（~8,200 x g）离心 3 min，打开盖子室温晾干 2-3 min，以干燥基质膜上残留乙醇。

注：该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。

13.取出吸附柱 SC3，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1-2 mL 洗脱缓冲液 EB（为提高洗脱效率，Buffer EB 可预先在 65-75℃水浴中加热），室温放置 2 min，8,000 rpm（~8,200 x g）离心 1 min。为了增加质粒的回收效率，可以将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 min，8,000 rpm（~8,200 x g）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 800 μL，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

14.将所得 DNA 洗脱液置于-20℃保存或直接用于后续实验。

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。