

产品组分

组分名称	组分编号	规格
		50 RXN
Buffer BL2	RM30468	25 mL
Buffer S1	RM30469	30 mL
Buffer S2	RM30470	30 mL
Buffer S3	RM30471	30 mL
Buffer ToxOut	RM30472	30 mL
Buffer W2	RM30473	15 mL
Buffer EB2	RM30474	15 mL
RNase A (10 mg/mL)	RM30475	300 uL
Spin Columns 5	RM30476	50 pk
Collection Tubes	RM30477	50 pk

产品说明

本试剂盒适用于无内毒素质粒 DNA 的小提中量制备。菌体经碱裂解、高盐、低 pH 处理后，质粒释放出来，并特异、高效地被离心柱硅胶膜吸附。再经内毒素清除液清洗可将绝大多数菌体内毒素清除干净，然后通过漂洗液的清洗可去除蛋白及其他杂质，最后在低盐、高 pH 条件下洗脱得到高纯度无内毒素的质粒 DNA。使用本试剂盒可从 5 ~ 12 mL 过夜培养的菌液中纯化得到高达 70 ug 的无内毒素质粒 DNA，纯化的质粒 DNA 可适用于各种常规操作，包括常规的细胞转染、酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译等。

保存温度

常温运输，室温（15~30℃）保存；

当 RNase A 加入 Buffer S1 后，需 2-8℃ 保存。

注意事项

1. 试剂盒中提供有 RNase A，瞬时离心后将所有 RNase A 溶液加入 Buffer S1，混匀后置于 2-8℃ 保存。使用前需在室温中放置一段时间，恢复至室温后使用。
2. 第一次使用前需先在 Buffer W2 中加入 45 mL 无水乙醇，用后应立即盖紧瓶盖，以防乙醇挥发。
3. 每次使用时都要注意 Buffer S2 和 Buffer S3 是否形成沉淀，如有沉淀 37℃ 溶解后再用。
4. 细菌培养时间一般为 12 ~ 16 小时，如接种量大则应减少培养时间，过度培养会降低质粒质量甚至导致质粒 DNA 突变。
5. 质粒的产量跟细菌量、质粒拷贝数、质粒大小和操作规程程度密切相关。
6. 如果所提质粒为低拷贝质粒，或大于 10 kb 的大质粒，或提取农杆菌质粒，或提取革兰氏阳性菌质粒，应加大菌体使用量，使用 5 ~ 12 mL 过夜培养物，同时按照比例增加 Buffer S1、Buffer S2、Buffer S3 的用量，洗脱液 Buffer EB 应在 60℃ 水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。

操作说明

1. 柱平衡: 向吸附柱 Spin Columns 5 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 400 μL 的平衡液 **Buffer BL2**, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min, 弃收集管中滤液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注: 平衡液处理过的柱子尽量当天使用, 避免放置时间过长影响后续实验效果。

2. 取 5 ~ 12 mL 过夜培养的菌液, 室温 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min, 尽量将上清去除干净。

注: 菌液量较多可分次加入管中离心, 收集菌体; 菌体量不易过多, 否则会裂解不充分。

3. 加入 500 μL **Buffer S1** (请先检查是否已加入 RNase A), 旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀。

注: 菌体沉淀一定要悬浮均匀, 如有未彻底悬浮的菌块会影响裂解, 导致提取的质粒浓度及纯度降低。

4. 加入 500 μL **Buffer S2**, 温和颠倒混匀使菌体完全裂解, 直到溶液变成清亮、粘稠。

注: 轻轻颠倒混匀, 不要剧烈震荡, 以免打断基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过 5 min, 以免质粒受到破坏。如果溶液未变得清亮, 提示可能菌量过大, 可增加 Buffer S2 的用量, 在后续的操作中 Buffer S3 的用量也要相应增加。

5. 加入 500 μL **Buffer S3**, 立即温和颠倒混匀, 可见红黄相间的沉淀物产生, 继续混匀直到完全变为黄色, 室温静置 2 min, 然后 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 5 min。

注: Buffer S3 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀, 如果上清中还有紫色漂浮物, 说明复性不充分, 继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。

6. 小心将上清液转移到一个新的离心管中, 加入 0.3 倍体积的异丙醇, 混匀。然后将上述液体转入吸附柱中, 静置 2 min, 让质粒 DNA 与吸附柱中的硅胶膜充分结合。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 s, 弃收集管中滤液。

注: 吸附柱的最大容积为 750 μL , 剩余液体分次过柱。

7. 向吸附柱中加入 500 μL **Buffer ToxOut**, 室温静置 5 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min, 弃收集管中滤液。

8. 加入 600 μL **Buffer W2** (请先检查是否已加入无水乙醇), 室温 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 s, 弃收集管中滤液。

注: Buffer W2 为浓缩液, 按要求加入无水乙醇, 用后应立即盖紧瓶盖, 以防酒精挥发。

9. 加入 500 μL **Buffer W2**, 室温 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 min, 甩干残留液体。

注: 此步不能省略, 否则残留乙醇会影响下游实验。

10. 将吸附柱置于一个新的 1.5 mL 离心管 (自备) 中, 加入 100 ~ 300 μL 的洗脱液 **Buffer EB2** 至吸附膜的中央, 室温放置 2 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。

注: 为增加洗脱效率, 可将洗脱液在 60°C 预热。Buffer EB 成分单一, 不会影响下游的酶切, 转染或者其他分子生物学实验, 请放心使用。不提倡用去离子水洗脱, 如必须使用去离子水洗脱, 请先用 NaOH 调整其 pH 值在 8.0 - 8.5 之间后才用于洗脱。为了增加质粒回收率, 可将得到的溶液重新加入到离心管中, 室温放置 2 min, 再次离心收集。

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 $\mu\text{g/mL}$ 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判断。处于环状或者超螺旋状态的质粒, 泳动位置不确定, 无法通过电泳知道其确切大小。