

Accuraf 快速质粒小提试剂盒

Accuraf Rapid Mini Plasmid Kit

RM0041

产品介绍

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，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，再通过漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

产品内容

试剂盒组成	保存	DP101-01
		100 次
平衡液 BL	室温	60ml
RNaseA (10mg/ml)	-20°C	300µl
溶液 P1	室温	30ml
溶液 P2	室温	30ml
溶液 P3	室温	40ml
去蛋白液 PE	室温	31.5mL
		第一次使用前加入 18.5mL 无水乙醇
漂洗液 WB	室温	25ml
		第一次使用前加入 100ml 无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AC	室温	100 个
收集管 (2ml)	室温	100 个

保存条件

本产品收到后按照上面指示温度存放各成份，储存 18 个月不影响使用效果。

产品特点

- 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
- 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

自备试剂：无水乙醇

操作方法

- 第一次使用前请先在漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶中加入指定量无水乙醇，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！
 - 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8°C 保存。
 - 将溶液 P3 放在冰上预冷，可以提高产量。
1. 可选步骤：向吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中）加 500µl 的平衡液 BL，12,000rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
 2. 取 1.5-4.5ml 过夜培养的菌液 12,000rpm 离心 30 sec，尽可能的倒干上清，收集菌体。

- 3.用 250 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。
- 4.加 250 μ l 的溶液 P2，温和地上下翻转 4-7 次使菌体充分裂解。
- 5.加 350 μ l 溶液 P3，立即温和地上下翻转 4-7 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀，12,000rpm 离心 5 min，小心取上清。**加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。**
- 6.将上一步所得上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液。
可选步骤:加入 500 μ l 去蛋白液 PE，12,000rpm 离心 30-60sec，弃废液。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 和 DH5 α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。
- 7.加入 500 μ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000rpm 离心 30 sec，弃掉废液。
- 8.重复步骤 7。
- 9.将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000rpm 离心 2 min，将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 10.取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，室温放置 10 min。
- 11.在吸附膜的中间部位加 50 μ l-100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 min，12,000rpm 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。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，但是最小体积不应少于 50 μ l，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响，应保证 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。

注意事项

- 1.第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100 μ g/ml）于 4 $^{\circ}$ C 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。
- 2.环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37 $^{\circ}$ C 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。
- 3.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
- 4.本试剂盒适用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5 α 等核酸酶含量低缺陷型菌株。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，应购买本公司生产的高纯度质粒小量快速提取试剂盒。
- 5.溶液 P3 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒，建议接种单菌落于 1.5-4.5ml 加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 14-16 个小时，可提取出多达 20 μ g 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应适当加大菌体使用量，使用 5-10ml 过夜培养物，同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量，其它步骤相同。
- 6.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 μ 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。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。
- 7.洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在 -20 $^{\circ}$ C。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。