

质粒小量提取试剂盒(磁珠法)

产品信息:

组成	保存	CZ201-01 100 次	CZ201-02 200 次
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	300μl	300μl×2
溶液 P1	4℃	30ml	30ml×2
溶液 P2	室温	30ml	30ml×2
溶液 P3	室温	40ml	40ml×2
漂洗液 WB	室温	25ml 第一次使用前加入 100ml 无水乙醇	25ml×2
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml	10ml×2
Magbead 磁珠	4℃	5ml	5ml×2

保存条件: 本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

储存事项:

- 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 100ug/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。
- 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℃ 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。

产品介绍:

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞, **磁珠**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 从磁珠上洗脱。适用于各种类型的质粒 DNA 提取, 可配合各类核酸提取仪或自动化/半自动化工作站。

产品特点:

- 1.耗时少: 质粒 DNA 提取周期在 30 分钟左右。
- 2.操作简便: 提取过程只需离心一次。

3. 无毒无害：试剂中不含有氯仿，酚等有毒物质。
4. 效果稳定：OD260/OD280 稳定在 1.7-1.9 之间，产量较其他方法高，提取的质粒可直接用于测序等下游实验。
5. 自动化：可配合国内外各类磁棒式核酸提取仪或核酸提取工作站。

自备仪器及试剂：小型离心机、磁力架(博迈德)、无水乙醇

注意事项：

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 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。**
3. 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1.5-4.5 ml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5-10 ml过夜培养物，同时按比例增加P1、P2、P3的用量，其它步骤相同。
4. 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%。**
5. **质粒DNA确切分子大小，必须酶切线性化后**，对比DNA分子量Marker才可以知道。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。
6. **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（10mM Tris-HCl，1mM 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。

操作步骤：

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 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 $^{\circ}$ C 保存。
- ⇒ 将溶液 P3 放在冰上预冷，可以提高产量。

1. 取 2-4 ml 过夜培养的菌液，9,000rpm 离心 30 秒，尽可能的倒干上清，收集菌体。
2. 用 250 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。
3. 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。
4. 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，13,000rpm 离心 5 分钟，小心取上清。
5. 小心将离心后获得的上清倒入 1.5ml 的尖端离心管中，千万不要将白色沉淀物倒入管中。
6. 每个离心管中加入 50 μ l 的 Magbead 磁珠（磁珠也可以预先加到离心管中）。
7. 将离心管放在合适型号的振荡器上，震荡结合 5 分钟(或者将离心管颠倒混匀 10 秒钟)。
注意：设定的震荡速度一定要将磁珠完全震荡起来，让磁珠充分捕获质粒 DNA。
8. 将离心管放于磁力架上静置 2 分钟，待磁珠完全吸附于离心管的侧壁上后，带着磁力架倒转离心管快速倒掉上清（保持离心管固定在磁力架上）。
9. 从磁力架上取下离心管置于普通离心管架上，加入 500 μ l 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇**），涡旋震荡 10 秒钟，使磁珠充分悬浮于漂洗液 WB 中(或者将离心管颠倒混匀 10 秒钟)。
10. 振荡结束后，用手甩，将粘在盖上的磁珠和液滴甩下。
11. 将离心管放于磁力架上静置 2 分钟，待磁珠完全吸附于离心管侧壁上后，带着磁力架倒转离心管快速倒掉上清（保持离心管固定在磁力架上）。
12. 重复 9-11。
13. 保持离心管固定于磁力架上，待磁珠完全吸附于离心管侧壁上后，用移液器小心吸掉管底和管盖上的残余液体（一旦吸到磁珠，可以打掉液体再让磁铁吸附一下磁珠）。敞开口室温放置 15 分钟以挥发乙醇。也可用电风扇对着离心管口吹风以加速乙醇挥发，以肉眼观察不到离心管底部有液滴残留时为止。乙醇挥发过程中需避免磁珠的过度干燥。
14. 从磁力架上小心取下离心管置于普通离心管架上，向每个离心管中加入 50-60 μ l 的洗脱缓冲液 EB 或去离子水，涡旋震荡保证磁珠完全悬浮于洗脱缓冲液 EB 中。室温静止放置 1 分钟。
15. 将离心管放置在磁力架上静置 2 分钟，待磁珠完全吸附于离心管侧壁上后，用吸头将 40-50 μ l 液体到一个新的 1.5ml 的离心管中。**注意：**1. 不要吸到磁珠；2. 装质粒 DNA 的离心管与带磁珠的离心管一一对应。