



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 010-58437227 82598075

Fax: 010-82597807

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@163.com](mailto:real-times@163.com)

## 高纯质粒小提试剂盒 (目录号: RTP2101)

### ● 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTP2101-02 (100次)	RTP2101-03 (200次)	贮存方式
RNase A	300 $\mu$ l	600 $\mu$ l	-20 $^{\circ}$ C
Lysis Dye	600 $\mu$ l	2 $\times$ 600 $\mu$ l	室温
溶液 P1	30 ml	60 ml	室温 (加入 RNase A 后 2-8 $^{\circ}$ C 保存)
溶液 P2	30 ml	60 ml	室温
溶液 P3	40 ml	80 ml	室温
去蛋白液 PD	60 ml	120 ml	室温
漂洗液 PW	25 ml	2 $\times$ 25 ml	室温
洗脱缓冲液 EB	15 ml	15 ml	室温
质粒吸附柱 CP	100 个	2 $\times$ 100 个	室温
收集管 (2 ml)	100 个	2 $\times$ 100 个	室温
说明书	1 份	1 份	

### ● 储存条件和效期:

本试剂盒在室温 (25 $^{\circ}$ C 左右) 干燥条件下, 可保存 1 年; 更长时间的保存可置于 2-8 $^{\circ}$ C。2-8 $^{\circ}$ C 保存条件下, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37 $^{\circ}$ C 下溶解沉淀至溶液澄清后再使用。单独包装的 RNase A 在 -20 $^{\circ}$ C 可稳定保存 1 年以上。加入 RNase A 后的溶液 P1 应置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存, 可稳定保存半年。

### ● 产品简介及使用说明:

本试剂盒采用经典的碱裂解法裂解细菌, 再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合 DNA 的特性, 可以从 1-5ml 大肠杆菌 LB 培养液中快速提取 3-20 $\mu$ g 纯净的高拷贝质粒 DNA。提取的质粒可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接和转化等实验。然而, 对质粒纯度要求更高的转染实验 (要求无内毒素), 此试剂盒不能达到要求。另外, 尽管该试剂盒可以抽提较大的质粒 (>10kb), 但我们不推荐使用。如果一定要使用, 请参考以下方法: 加大菌体使用量 (使用 5-10 ml 过夜培养物), 同时按照比例增加 P1、P2、P3 的用量; 洗脱缓冲液应在 70 $^{\circ}$ C 预热, 在吸附和洗脱时可以适当的延长延长时间, 以增加提取效率, 其它步骤相同。

### ● 产品特点:

- 1 使用了 Lysis Dye, 菌体裂解是否完全一目了然。由于判断菌体裂解和中和是否彻底更主要取决于操作者的经验, 所以我们增加了 Lysis Dye (一种能使裂解/中和体系变换颜色的试剂) 来帮助观察裂解/中和的程度。加入 P1 后, Lysis Dye 使菌液变为浑浊的红色; 加入 P2 后, Lysis Dye 立即使溶液变为澄清的红色, 裂解是否完全只要观察红色溶液是否澄清, 如果红色非常均匀, 表明裂解充分; 在完全裂解的体系中加入 P3 混匀后, 体系立即变为黄色, 任何红色的残留表明没有完全混匀或者中和不彻底。
- 2 增加了去蛋白液 PD, 能更加彻底地去除蛋白污染, 得到纯度更高的质粒。

## ● 准备工作:

- 1 将试剂盒附带的 RNase A 全部加入到溶液 P1 中 (如 15ml P1 中加入 150 $\mu$ l RNase A), 混匀后 4 $^{\circ}$ C 贮存。
- 2 按照标签所示在漂洗液 PW 中加入无水乙醇, 混匀后盖紧瓶盖后室温贮存备用。
- 3 每次使用前请检查溶液 P2, 溶液 P3 和去蛋白液 PD 是否有沉淀生成, 如果出现沉淀, 37 $^{\circ}$ C 温浴至沉淀溶解后再使用。

## ● 使用 Lysis Dye 的标准操作步骤:

如非指出, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1. 取 1–5 ml 过夜培养的菌液加入离心管中, 10,000g 离心 1 分钟, 尽量吸除上清。  
**注:** 菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中。
2. 向菌体沉淀的离心管中加入 250  $\mu$ l 溶液 P1 (请先检查是否已加入 RNaseA) 和 5 $\mu$ l Lysis Dye, 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀, 此时溶液为浑浊的红色。  
**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 250  $\mu$ l 溶液 P2, 温和地上下翻转 6–8 次使菌体充分裂解, 此时溶液变为澄清的红色。  
**注:** 温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免污染基因组 DNA; 所用时间绝对不应超过 5 分钟, 以免质粒受到破坏; 红色溶液应该透明均一, 如有浑浊红色颗粒, 表明裂解不充分, 会大大降低质粒提取效率。
4. 加入 350  $\mu$ l 溶液 P3, 立即温和地上下翻转, 充分混匀, 混匀充分的标志是溶液完全呈透明的黄色, 如有可见红色, 说明混匀不彻底。10,000g 离心 10 分钟。  
**注:** P3 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。
5. 小心地将上清转移到吸附柱 CP 中 (吸附柱放入收集管中), 10,000g 离心 30–60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP 重新放回收集管中。
6. 向吸附柱 CP 中加入 500  $\mu$ l 去蛋白液 PD, 10,000g 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP 重新放回收集管中。
7. 向吸附柱 CP 中加入 700  $\mu$ l 漂洗液 PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 10,000g 离心 30–60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP 重新放回收集管中。
8. 向吸附柱 CP 中加入 500  $\mu$ l 漂洗液 PW, 10,000g 离心 30–60 秒, 倒掉收集管中的废液。
9. 将吸附柱 CP 置于重新放回收集管中, 10,000g 离心 2 分钟。  
**注:** 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 绝对不可省略, 因为漂洗液中乙醇的残留会影响后续实验 (酶切, PCR 等)。
10. 将吸附柱 CP 置于一个干净的 1.5ml 离心管中, 向吸附膜的中央部位悬空滴加 50–100  $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 分钟, 10,000g 离心 2 分钟将质粒溶液收集到离心管中, -20 $^{\circ}$ C 保存。  
**注:** ● 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的洗脱液重新加入离心吸附柱中, 再次离心收集。  
● 洗脱缓冲液体积不应少于 50  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。  
● 洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0–8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。

## ● 不使用 Lysis Dye 的标准操作步骤:

如非指出, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1. 取 1–5 ml 过夜培养的菌液加入离心管中, 10,000 g 离心 1 分钟, 尽量吸除上清。  
**注:** 菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中。
2. 向菌体沉淀的离心管中加入 250  $\mu$ l 溶液 P1 (请先检查是否已加入 RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

**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 250  $\mu\text{l}$  溶液 P2，温和地上下翻转 6–8 次使菌体充分裂解。

**注：**温和地混合，不要剧烈震荡，以免污染基因组 DNA；**所用时间绝对不应超过 5 分钟，以免质粒受到破坏。**

4. 加入 350  $\mu\text{l}$  溶液 P3，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。10,000g 离心 10 分钟。

**注：**P3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

5. 小心地将上清转移到吸附柱 CP 中（**吸附柱放入收集管中**），10,000g 离心 30–60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP 重新放回收集管中。

6. 向吸附柱 CP 中加入 500  $\mu\text{l}$  去蛋白液 PD，10,000g 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP 重新放回收集管中。

7. 向吸附柱 CP 中加入 700  $\mu\text{l}$  漂洗液 PW（**请先检查是否已加入无水乙醇**），10,000g 离心 30–60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP 重新放回收集管中。

7. 向吸附柱 CP 中加入 500  $\mu\text{l}$  漂洗液 PW，10,000g 离心 30–60 秒，倒掉收集管中的废液。

8. 将吸附柱 CP 置于收集管中，10,000g 离心 2 分钟。

**注：**此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，绝对不可省略，因为漂洗液中乙醇的残留会影响后续实验（酶切，PCR 等）。

9. 将吸附柱 CP 置于一个干净的 1.5ml 离心管中，向吸附膜的**中央部位**悬空滴加 50–100  $\mu\text{l}$  洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟，10,000g 离心 2 分钟将质粒溶液收集到离心管中，-20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

**注：**● 为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入离心吸附柱中，再次离心收集。

● 洗脱缓冲液体积不应少于 50  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。

● 洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。