



Plasmid Rapid Amplification Kit

使用前请仔细阅读说明书（仅供科研实验使用）

保存：-20°C，一年

本产品是一种利用随机引物和滚环复制系统扩增 DNA 的试剂盒。可在 1-2 小时内将 1 pg-1 ng 质粒 DNA 扩增至 5-20 μg ，或者 1-3 小时内将 0.001-0.5 μl 菌液（OD 1.0）中的质粒扩增至 5-20 μg 。本试剂盒使用的 DNA 复制系统具有 3'→5'核酸外切酶活性，保真性非常高，突变率比 Taq 酶低 3000 倍。

该试剂盒制备的质粒 DNA 经单、双酶切后的产物和常规质粒酶切后的产物相同，可用于下一步连接反应。适用于质粒的亚克隆，转录模板 DNA 的制备，一代测序质粒模板制备，以及质粒克隆的酶切鉴定等。

产品组成

组分名称	RPR-01	RPR-02
10×PRA Buffer	100 μL	200 μL
5×PRA Substrate	200 μL	400 μL
PRA Enzyme	50 μL	100 μL
ddH ₂ O	1 mL	1.6 mL

操作步骤

1、质粒扩增（若为菌液扩增使用新鲜菌液效果较好，不要使用冻存时间过长的表达菌比如 BL21 扩增质粒）

推荐反应体系（共 20 μL ）：

组分	体积（ μL ）
菌液(OD ≤ 1)或者质粒(≤ 1 ng)	0.1-1
10×PRA Buffer	2
5×PRA Substrate	4
ddH ₂ O	加至总体积 19 μL

95°C加热 3 分钟（95°C加热时间过长会产生非特异性扩增），以 0.1°C/s 的速度将至 25°C，取出后稍离心，加入 1 μL PRA Enzyme，混匀。42°C反应 1-3 小时。反应结束后，70°C加热灭活 10 分钟。

2、扩增质粒检测(以下两种方案可选)

1) 限制性内切酶切扩增质粒

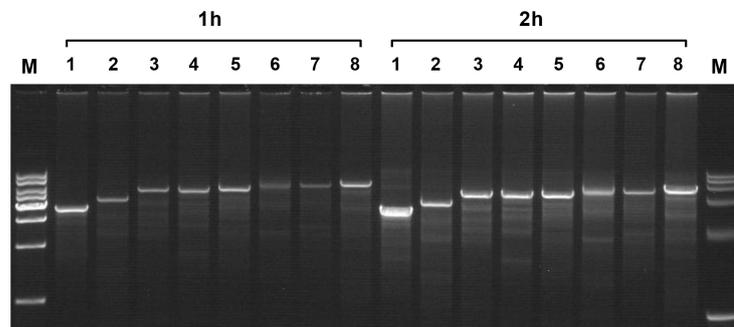
配限制性内切酶反应体系，加入 1/5 体积上述质粒扩增产物，酶切 30-60 分钟。扩增质

粒片段的酶切产物可以通过琼脂糖凝胶电泳检测。(本试剂盒 buffer 兼容大部分 NEB 公司 HF 内切酶以及 Fermentas 公司快速内切酶, 可以直接在反应体系中加上上述内切酶, 除此之外的内切酶反应时需要使用相应的 buffer 按上述操作将扩增产物稀释 5 倍)。酶切后产物片段和使用环状质粒酶切后产生片段完全一样, 可以通过琼脂糖凝胶电泳切胶回收。

2) 制备一代测序模板

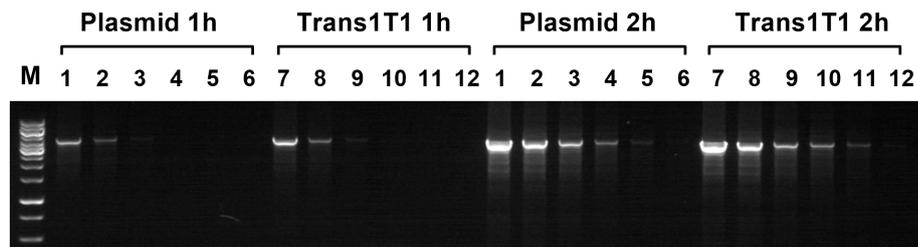
扩增产物 70°C 加热灭活后, 加入 2U 碱性磷酸酶, 37°C 反应 30 分钟, 95°C 3 分钟灭活。取 2-6 μL 反应液作为测序模板。

质粒扩增案例:

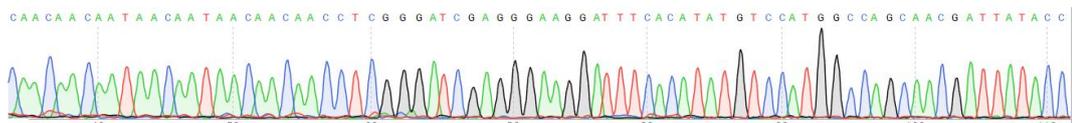


案例 1: 不同质粒在 42°C 扩增 1 或者 2 小时后, 使用限制性内切酶单酶切后电泳图。

1: p011 T-vector; 2: PBI-CMV; 3: pET28a; 4: pIRES2-EGFP; 5: pACYC-dut1; 6: pGL4.29; 7: pCAG; 8: pCold-I。扩增产物点样 1 μL 。



案例 2: 从不同浓度 T 载体质粒或含载体菌液中扩增质粒, 1-2 小时后单酶切检测扩增产物。1-6 分别是 p011 T-vector 质粒 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg 作为模板。7-12 分别是含 p011 T-vector 的 TransIT1 菌液 (OD 约 1.0) 稀释 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000 倍后取 1 μL 做模板。扩增产物点样 1 μL 。



案例 3: 含 pmal-c5x 质粒的菌液使用本试剂盒 42°C 扩增 2 小时后, 加入 2 U 碱性磷酸酶 37°C 反应 30 分钟, 95°C 3 分钟灭活。取 6 μL 反应液作为测序模板, 使用 mal E 引物测序结果。



微信公众号

网址: www.ruoyubio.com

邮箱: service@ruoyubio.com

湖南若鱼生物科技有限公司

Hunan Ruoyu Biotech Co., Ltd.