

质粒小提试剂盒（离心柱型）

Mini Plasmid Kit

试剂盒组成：

产品组成	50T	200T
平衡液 BL (Buffer BL)	30ML	120ML
溶液 P1 (Buffer P1)	15ML	60ML
溶液 P2 (Buffer P2)	15ML	60ML
溶液 P3 (Buffer P3)	20ML	80ML
去蛋白液 PD (Buffer PD)	30ML	120ML
漂洗液 PW (Buffer PW)	15ML	50ML
洗脱缓冲液 EB (Buffer EB)	15ML	30ML
RNase A (10mg/ml)	150ul	600ul
吸附柱	50 个	200 个
收集管 (2ML)	50 个	200 个

产品简介：

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA，离心吸附柱中采用硅基质材料为本公司新型材料，高效，专一吸附 DNA。以下操作步骤适用于提取 1-5ml 过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作，包括---酶切，PCR，测序，连接，转化，文库筛选，体外翻译，转染一些常规的传代细胞等。

提取得率：

质粒类型	菌液量	得率	质粒
低拷贝	1-5ml	3-12ug	pBR322, pACYC 及其衍生载体, pSC101 及其衍生载体, SuperCos, pWE15
高拷贝	1-5ml	6-30ug	pTZ, pUC, pBS, pGM-T



操作步骤:

使用前请先在 **Wash Buffer** 中加入无水乙醇, 加入体积请参考瓶上的标签提示。

1---柱平衡步骤: 向吸附柱中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500ul 的平衡液, 12000rpm (-13400×g) 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。 (请使用当天处理过的柱子)

2---取 1-5ml 过夜培养的菌液, 加入离心管中, 使用常规台式离心机, 12000rpm (-13400×g) 离心 1min, 尽量吸除上清 (菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

3---向留有菌体沉淀的离心管中加入 250ul Buffer P1 (请先检查是否已加入 RNase A), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

注意: 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。

4---向离心管中加入 250ul Buffer P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。

注意: 温和地混合, 不要剧烈的震荡, 以免打断基因组 DNA, 造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段, 此时菌液应变的清亮粘稠, 所用时间不应超过 5min, 以免质粒受到破坏。如果未变得清凉, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体的量。

5---向离心管中加入 350ul Buffer P3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀, 12000rpm (-13400×g) 离心 10min。

注意: Buffer P3 加入后立即混合, 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。

6---将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱中 (吸附柱事先放在收集管中), 注意尽量不要吸出沉淀, 12000rpm (-13400×g) 离心 30-60s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

7---可选步骤: 向吸附柱中加入 500ul Buffer PD, 12000rpm (-13400×g) 离心 30-60S, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

如果宿主菌是 end A(+) 宿主菌 (TG1, BL21, HB101, JM 系列, ET12567 等), 这些宿主菌含有大量的核酸酶, 易降解质粒 DNA, 推荐采用此步。

如果宿主菌是 end A (-) 宿主菌 (DH5α, TOP10 等), 此步可省略。

8---向吸附柱中加入 600ul Wash Buffer (请先检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm (-13400×g) 离心 30-60s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

9---重复操作步骤 8。

10---将吸附柱放入收集管中, 12000rpm (-13400×g) 离心 2min, 目的是将吸附柱中的残余的 Wash Buffer 去除。

注意: Wash Buffer 中的乙醇残留会影响后续的酶反应 (酶切, PCR 等) 实验, 为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 建议将吸附柱开盖, 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的 Wash Buffer。



11---将吸附柱置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 50-100ul *Elution Buffer*，室温放置 2min，12000rpm (-13400×g) 离心 2min 将质粒溶液收集到离心管中。

注意: *Elution Buffer* 溶液体积不应少于 50ul，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的影响，若后续做测序，需使用 ddH₂O 做洗脱液，并保证其 PH 值在 7.0-8.5 范围内，PH 值低于 7.0 会降低洗脱效率，且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解，为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm (-13400×g) 离心 2min，将质粒溶液收集到离心管中。

低拷贝或大质粒 (>10kb) 提取:

如果所提取的质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，使用 5-10ml 过夜培养物，同时按照比例增加 P1,P2,P3 的用量，洗脱缓冲液 *Elution Buffer* 应在 65-70℃ 水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当延长延长时间，以增加提起效率，其他步骤相同。

注意事项:

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 1--- Buffer P1 在使用前先加入 RNase A(将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入)，混匀，置于 2-8℃ 保存。
- 2---使用前请先检查 Buffer P2, Buffer P3 是否出现浑浊，如有浑浊现象可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
- 3---注意不要直接接触 Buffer P2, Buffer P3，使用后应立即盖紧盖子。
- 4---所有离心步骤均为使用常规的台式离心机室温下进行离心，速度为 12000rpm (-13400×g)。
- 5---提取的质粒量与细菌培养的浓度，质粒拷贝数等因素有关。
- 6--- Buffer PD 可以有效去除残留的蛋白污染，宿主菌是 end A(+) 宿主菌 (TG1, BL21, HB101, JM 系列, ET12567 等)，这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒 DNA，推荐采用去蛋白液 Buffer PD。

保存温度:

本试剂盒置于 (15-30℃) 干燥条件下，可保存 1 年，若溶液产生沉淀，使用前可在 37℃ 水浴中预热 10min 以溶解沉淀，不影响效果，第一次使用前将 RNase A 加入 Buffer P1 中，混匀后置于 2-8℃ 保存，可稳定保存 6 个月，单独包装的 RNase A 在室温可稳定保存 12 个月。

温馨提示: 实验前做好个人安全的防护。

