

## 高纯度质粒小提试剂盒

项目号: P666142

储存条件: 室温。

## 产品内容

组分	/
Buffer P1	60ml
Buffer P2	60ml
Buffer N3	80ml
Buffer PB	35ml
Buffer PW (concentrate)	25ml
Buffer EB	30ml
RNase A (10mg/ml)	600 $\mu$ l
Spin Columns DM with Collection Tubes	200

## 产品简介

本试剂盒适合提取 1-5 ml 菌液, 在碱裂解法裂解细胞的基础上, 采用独特的硅基质膜吸附技术和试剂配方, 通过离心吸附柱在高盐状态下高效专一的结合溶液中的质粒 DNA, 每个吸附柱最高可吸附 30  $\mu$ g 的质粒 DNA, 并最大限度的去除蛋白质、基因组、RNA 和其他杂质。得到的质粒 DNA 可直接用于细胞转染、PCR、酶切、测序、连接等生物学实验。

**自备试剂:** 无水乙醇。

## 实验前准备及重要注意事项

1. 所有组分可在干燥、室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 环境稳定保存 1 年, 将吸附柱置于 2-8 $^{\circ}$ C 可保存更长时间, 加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8 $^{\circ}$ C 可稳定保存 6 个月。
2. 第一次使用前, 将 RNase A 溶液全部加入到 Buffer P1 中, 混匀, 置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存, 使用前需在室温中放置一段时间, 恢复至室温后使用。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在 Buffer PW 中加入无水乙醇。
4. 使用前若发现 Buffer P2、Buffer N3、Buffer PB 有沉淀, 可在 37 $^{\circ}$ C 水浴几分钟, 即可恢复澄清 (请勿剧烈晃动 Buffer P2)。
5. 注意不要直接接触 Buffer P2、Buffer N3 和 Buffer PB, 使用后应立即盖紧盖子。
6. 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。

## 操作步骤

1. 取 1-5ml 过夜培养的菌液加入离心管（自备）中，13,000 rpm ( $\sim 16,200\times g$ ) 离心 30 秒收集菌体沉淀，尽量吸弃上清。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250  $\mu$ l Buffer P1（请先检查是否已加入 RNase A），使用移液器或涡旋振荡器充分混匀，悬浮菌体沉淀。

注意：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，导致提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入 250  $\mu$ l Buffer P2，温和地上下颠倒混匀 4-6 次，充分混匀使菌体裂解，此时溶液应变得清亮粘稠。

注意：温和混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。此步骤所用时间应不超过 5 分钟，避免质粒受到破坏。

4. 向离心管中加入 350  $\mu$ l Buffer N3，立即温和地上下颠倒混匀 8-10 次，充分混匀，此时应出现白色絮状沉淀。13,000 rpm 离心 5 分钟。

注意：Buffer N3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。

5. 将步骤 4 中所得的上清液转移到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中，13,000 rpm 离心 30 秒钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入 150  $\mu$ l Buffer PB，13,000 rpm 离心 30 秒。

7. 向吸附柱中加入 400  $\mu$ l Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），13,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。

8. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附膜的中间部位加入 50-100  $\mu$ l Buffer EB，室温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。 $-20^{\circ}\text{C}$  保存质粒。

注意：1) 为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或  $>10$  kb 时，Buffer EB 在  $65-70^{\circ}\text{C}$  水浴预热，可以增加提取效率。