

## 高纯质粒小量提取试剂盒

货号：DP101-01

规格：100次

保存：15-25℃

### 【产品概述】

本产品采用改良的碱裂解-中和法，结合硅胶膜吸附技术，使质粒 DNA 获得高效、专一的吸附。经过两步洗涤，清除基因组 DNA、RNA、蛋白质及其他杂质，被吸附的质粒 DNA 随后被低盐缓冲液从离心吸附柱上洗脱下来。得到的质粒可直接用作荧光测序的模板，以及 PCR、酶切、连接、转化、体外转录等常规分子生物学实验。

### 【产品组分】

货号	组分	体积
DP101-101	溶液P1	25 ml
DP101-102	溶液P2	25 ml
DP101-103	溶液P3	35 ml
DP101-104	漂洗液WB（初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀）	25 ml
DP101-105	洗脱缓冲液（EB）	15 ml
DP101-106	去蛋白液PE（初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀）	32 ml
DP101-107	RNase A 溶液 4℃保存 12 个月，-20℃长期保存	250 μl
DP101-108	平衡液	10 ml
DP101-109	离心吸附柱及收集管	100套

### 【保存条件】

常温运输，室温（15-25℃）保存，有效期24个月。独立包装的RNase A在室温可稳定保存6个月，4℃保存12个月，-20℃长期保存。

### 【注意事项】

1. 将 RNase A 加入到P1溶液中，可于2-8℃保存3个月左右。如果溶液P1中RNase A时间久失活了，提取的质粒可能有微量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，可在37℃水浴加热几分钟恢复澄清，重新混匀，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
3. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到12,000 rpm 的台式离心机。
4. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。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20-30 μg的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10 kb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。
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。

### 【实验准备】

1. 初次使用前请先在漂洗液WB瓶和去蛋白液PE瓶中按指示加入无水乙醇，充分混匀，加入后请及时打钩标记。
2. 将RNase A全部加入溶液P1中，混匀。每次使用后置于2-8℃保存。

### 【操作步骤】

1. **柱平衡**：向吸附柱中加入100  $\mu$ l平衡液，12,000 rpm 离心1 min，弃滤液，备用。  
注：平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。
2. 取1.5–5 ml过夜培养的菌液加入1.5 ml离心管，12,000 rpm 离心30 sec，尽可能的倒干上清，收集菌体。  
注：如收集超过1.5 ml菌液，可以离心弃上清后，在同一个1.5 ml管内加入更多的菌液，重复步骤1，直到收集到足够的菌体。
3. 加250  $\mu$ l 溶液P1重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。  
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. 加250  $\mu$ l的溶液P2，温和地上下翻转6–8次使菌体充分裂解，室温放置4–5 min。  
注：温和混匀，以免基因组DNA剪切断裂。所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
5. 加350  $\mu$ 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。12,000 rpm离心10 min。  
注：加入溶液P3后应该立即混匀，以免产生SDS的局部沉淀。
6. 小心吸取上清加入吸附柱中（吸附柱放入收集管中），避免吸取漂浮的白色沉淀。12,000 rpm离心30 sec，弃滤液。  
注：偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果，上清中含有少量微小白色沉淀对后续实验无不良影响，后续过滤漂洗过程中会去除。
7. 加入500  $\mu$ l去蛋白液PE（**请确认已加入无水乙醇**），12,000 rpm离心15 sec，弃滤液。  
注：此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为JM系列、HB101等endA菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，残留核酸酶可能导致质粒降解或者下游酶切时候切散，应做此步骤；如所用菌株为XL-1 Blue、Top10和DH5 $\alpha$ 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可省略此步骤。
8. 加入600  $\mu$ l漂洗液WB（**请确认已加入无水乙醇**），12,000 rpm离心15 sec，弃滤液。再加入600  $\mu$ l漂洗液WB重复漂洗一次，弃滤液。
9. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm离心2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱，放入一个干净的离心管中，向吸附膜的**中央悬空滴加**50  $\mu$ l–100  $\mu$ l洗脱缓冲液EB，室温放置2 min，12,000 rpm 离心1 min。

#### 提示：

1. 洗脱体积建议不少于30  $\mu$ l，体积过小会影响核酸回收效率。
2. 以下步骤都可以帮助提高DNA产物浓度：
  - 1) 洗脱缓冲液事先在 80°C–90°C水浴中预热可提高产量。
  - 2) 将第一次洗脱液重新加入吸附柱，室温放置1 min，12,000 rpm离心1 min。洗脱两遍可提高浓度约10%。

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。