高纯度质粒小提试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF104

产品内容

产品组成	GF104-02 / (50 preps)
溶液 P1 (Buffer P1)	15 ml
溶液 P2 (Buffer P2)	15 ml
溶液 P3 (Buffer P3)	15 ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	15ml（使用前先加入 60ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	375 ul
过滤柱 CS1 (Filtration Columns CS1)	50 套
吸附柱 CP1 (Spin Columns CP1)	50 个
收集管(2 ml) (Collection Tubes 2 ml)	50 个

储存条件

该试剂盒置于室温(15-25℃)干燥条件下，可保存12个月，更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在37℃水浴中预热10min，以溶解沉淀。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中，混匀后置于2-8℃保存，可稳定保存12个月。单独包装的RNase A 在室温可稳定保存12个月以上。

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。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司新型材料，高效、专一吸附DNA。由于增加了过滤柱，与普通的提取方法相比，本试剂盒可去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物，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可适用于转染多种细胞及各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液 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. 使用前先检查溶液 P2 和 P3 是否出现浑浊，如有混浊现象，可在 37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 注意不要直接接触溶液 P2 和 P3，使用后应立即盖紧盖子。
4. 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心，速度为 12,000rpm(~13,400×g)。
5. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取1-5ml过夜培养的菌液加入离心管中，12,000rpm(~13,400×g)离心1min，尽量吸除上清（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. 向留有菌体沉淀的离心管中加入250ul溶液P1 （**请先检查是否已加入RNase A**），使用移液器吸吐或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

   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。

3. 向离心管中加入250ul溶液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片断。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过5min，以免质粒受到破坏。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 向离心管中加入250ul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。12,000rpm(~13,400×g)离心10min，用移液器小心地将上清转移到过滤柱CS1（**过滤柱放入收集管中**），注意尽量不要吸出沉淀。

   注意：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，可再次离心后取清。

5. 12,000rpm(~13,400×g)离心2min，小心地将离心后收集管中得到的溶液转移到吸附柱CP1中（**吸附柱放入收集管中**），（**如果过滤柱中有残余的液体说明步骤4吸取的上清中杂质过多，可以延长离心的时间；如果离心后收集管底部有少量的沉淀，尽量的吸取上清**）。

6. 12,000rpm(~13,400×g)离心30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP1放入收集管中。

7. 向吸附柱CP1中加入700ul漂洗液PW（**请先检查是否已加入无水乙醇**），12,000rpm(~13,400×g)离心30-60sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP1放入收集管中。

8. 重复操作步骤7。

9. 将吸附柱CP1放入收集管中，12,000rpm(~13,400×g)离心2min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

   注意：漂洗液中乙醇的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CP1开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。

10. 将吸附柱CP1置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加50-100ul洗脱缓冲液TB，室温放置2min，12,000rpm(~13,400×g)离心2min将质粒溶液收集到离心管中。

    注意：洗脱缓冲液体积不应少于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影响，若后续做测序，需使用ddH_2O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2 min，12,000 rpm(~13,400×g) 离心2 min，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5-10 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TB应在65-70℃水浴预热，**在吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率**。其它步骤相同。