高纯度质粒小提中量试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF107

产品内容

产品组成	GF107-02 / (50 preps)
溶液 P1 (Buffer P1)	30 ml
溶液 P2 (Buffer P2)	30 ml
溶液 P3 (Buffer P3)	30 ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	15ml（使用前请先加入 60ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	750 ul
过滤柱 CS1 (Filtration Columns CS1)	50 套（柱子不带盖，收集管带盖）
吸附柱 CP2 (Spin Columns CP2)	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，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，可高效、专一吸附DNA，另外由于增加了过滤柱，可去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。以下操作步骤适用于提取5-15ml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，如有浑浊现象，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。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，同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量，洗脱缓冲液应在 65-70℃预热。**可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。**

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5-15ml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。
注意：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，菌体量以能够充分裂解为佳，过多的菌体裂解不充分会降低质粒的提取效率。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入500ul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：请务必彻底悬浮细菌沉淀，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500ul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。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500ul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，此时在离心管底部形成沉淀。
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，可再次离心后取上清。
5. 将上一步收集的上清液分次加入过滤柱CS1（过滤柱放入收集管中），12,000rpm(~13,400×g)离心2min，小心地将过滤离心后收集管中得到的溶液分次加入吸附柱CP2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，尽量地吸取上清**）。
6. 12,000rpm(~13,400×g)离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP2放入收集管中。
7. 向吸附柱CP2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1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP2放入收集管中。
注意：加入漂洗液PW后，如果室温静置2-5min，有助于更好地去除杂质。
8. 重复操作步骤7。
9. 将吸附柱CP2重新放回收集管中置于12,000rpm(~13,400×g)离心2 min，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CP2开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
10. 将吸附柱CP2置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加100-300ul洗脱缓冲液TB，室温放置2min，12,000rpm(~13,400×g)离心1min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100ul，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2min，12,000rpm(~13,400×g)离心2min，将质粒溶液收集到离心管中。