质粒小提试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF103

产品内容

产品组成	GF103-02 (50 preps)	GF103-03 (200 preps)
溶液 P1 (Buffer P1)	15 ml	60 ml
溶液 P2 (Buffer P2)	15 ml	60 ml
溶液 P3 (Buffer P3)	15 ml	60 ml
漂洗液 PW (Buffer PW)	15ml（使用前请先加入60ml 无水乙醇）	60ml（使用前请先加入240ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 ml	60 ml
RNase A (10 mg/ml)	375 ul	1.5 ml
吸附柱 CP1(Spin Columns CP1)	50 个	200 个
收集管(2 ml)(Collection Tubes 2 ml)	50 个	200 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。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。

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. 使用前请先检查溶液 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常规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

可以通过多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，此时将出现白色絮状沉淀，12,000rpm(~13,400×g)离心10min。

   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. 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP1中（**吸附柱放入收集管中**），注意尽量不要吸出沉淀，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。

6. 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。

7. 重复操作步骤6。

8. 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。

9. 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$_2$O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。

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5-10ml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。