

版本号: DP140415

TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit

快速质粒小提试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP105

产品内容

产品组成	DP105-02 (50 preps)	DP105-03 (200 preps)
溶液P1 (Buffer P1)	15 ml	60 ml
溶液P2 (Buffer P2)	15 ml	60 ml
溶液P5 (Buffer P5)	20 ml	80 ml
漂洗液PWT (Buffer PWT)	15 ml	50 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	150 μ l	600 μ l
TIANRed	75 μ l	300 μ l
吸附柱CP3 (Spin Columns CP3)	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 $^{\circ}$ C) 干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8 $^{\circ}$ C。2-8 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C水浴中预热10 min, 以溶解沉淀。单独包装的RNase A在室温可保存12个月。加入RNase A和TIANRed后的溶液P1应置于2-8 $^{\circ}$ C保存, 可稳定保存6个月。

产品简介

本试剂盒对传统的碱裂解法进行了优化，可以在8 min内获得高质量质粒DNA。优化的裂解液可以使得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特有新型材料，高效、专一吸附DNA。以下操作步骤适用于提取1-4 ml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。

提取得率

质粒类型	菌液量	得率	质粒
低拷贝	1-4 ml	3-10 µg	pBR322, pACYC及其衍生载体 pSC101及其衍生载体, SuperCos, pWE15
高拷贝	1-4 ml	6-24 µg	pTZ, pUC, pBS, pGM-T

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和TIANRed (**将试剂盒中提供的RNase A和TIANRed全部加入**)，混匀，置于2-8℃保存。
 2. 使用前请先检查溶液P2和P5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P5，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12,000 rpm (~13,400×g)。
 5. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
 6. TIANRed的使用方法：TIANRed是一种指示剂，用以指示整个操作的正确性，对人体无害。使用时按照TIANRed:溶液P1=1:200进行混合，彻底颠倒混匀，混匀后的溶液为澄清的红色。将混匀后的溶液加入到收集好的菌体中彻底混匀，由于菌体的存在，混匀后的溶液为浑浊的红色；添加溶液P2之后彻底混匀后，溶液的颜色为澄清的紫色，则说明充分裂解；再添加溶液P5至彻底混匀后，溶液为澄清的黄色，说明中和复性充分。
-

操作步骤

使用前请先在漂洗液PWT中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取1-4 ml过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12,000 rpm (~13,400 ×g)离心1 min，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150 μl溶液P1（请先检查是否已加入RNase A和TIANRed），使用移液器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。

TIANRed试剂的加入对于后续PCR、酶切和测序都没有影响。使用时按照TIANRed:溶液P1=1:200进行混合，彻底颠倒混匀，混匀后的溶液为澄清的红色。将混匀后的溶液加入到收集好的菌体中彻底混匀，由于菌体的存在，混匀后的溶液为浑浊的红色。

3. 向离心管中加入150 μl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，以免污染基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，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。

由于使用了TIANRed，添加溶液P2彻底混匀后，溶液的颜色为澄清的紫色。如果在紫色中混杂有浑浊的红色，则说明裂解不充分，继续混匀直至溶液颜色完全变为澄清的紫色。

4. 向离心管中加入350 μl溶液P5，立即快速地上下颠倒混匀12-20次，充分混匀，此时将出现絮状沉淀。12,000 rpm (~13,400 ×g)离心2 min。

注意：加入溶液P5后应立即混合，应快速上下颠倒混匀，避免产生局部沉淀。上清中含有少量微小白色沉淀对后续实验没有任何影响。如果上清中存在大量微小白色沉淀，可再次离心后取上清。由于使用了TIANRed，添加溶液P5彻底混匀后，溶液为澄清的黄色，如果在黄色中混有紫色，则说明复性不充分，继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。

5. 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm (~13,400 ×g)离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。
-

-
6. 向吸附柱CP3中加入300 μ l漂洗液PWT (**请先检查是否已加入无水乙醇**)，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。
 7. 将吸附柱CP3放入收集管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心1 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。
 8. 将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加50-100 μ l洗脱缓冲液TB，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30 sec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50 μ l，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。
