

版本号: DP140108

TIANprep N96 Magnetic Plasmid Kit

N96磁珠法质粒DNA小提试剂盒

目录号: DP119

产品内容

产品组成	DP119 (2 plates)
RNaseA (10 mg/ml)	600 μ l
溶液P1 (Buffer P1)	60 ml
溶液P2 (Buffer P2)	60 ml
溶液P3 (Buffer P3)	80 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	50 ml
磁珠悬浮液G (MagAttract Suspension G)	3 \times 1 ml
96孔过滤板 (N96 Filtration Plate (H))	2 块
96孔深孔板 (N96 Well Plate)	4 块
洗脱缓冲液EB (Buffer EB)	30 ml
封口膜(Plate Cover)	10张

储存条件

本试剂盒在室温（15–25°C）干燥条件下，可保存12个月；更长时间的保存可置于2–8°C。在2–8°C保存条件下，若溶液产生沉淀，应在使用前置于37°C下溶解沉淀。溶液P1在加入RNase A后，应置于2-8°C保存，可稳定保存6个月。单独包装的RNase A可在室温保存12个月。

产品简介

本试剂盒采用具有独特分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统，从1-1.5 ml菌液中分离纯化2-20 µg高质量质粒DNA。独特包埋的磁珠，在一定条件下对质粒DNA具有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠释放吸附的质粒DNA，能够达到快速分离纯化质粒DNA的目的，可最大限度去除蛋白及其他杂质，从而保证提取质粒的纯度。

使用本试剂盒提取的质粒DNA可用于各种分子生物学实验，如酶切、测序、文库筛选、连接和转化等。

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使用前先加入RNaseA（加入比例为溶液P1:RNaseA = 100:1），混匀，置于2-8°C保存。
 2. 第一次使用前请按照瓶上标签在漂洗液PW中加入相应体积的无水乙醇。
 3. 使用前先检查溶液P2和P3是否出现浑浊，如有混浊现象，可置于37°C水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。溶液P2和P3使用后应立即盖紧盖子。
 4. 所有离心步骤均为室温下进行离心。
 5. 提取的质粒量与细菌的培养浓度、宿主菌、质粒拷贝数等因素有关。
 6. 磁珠悬浮液使用前需充分混匀。
-

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. 集菌步骤：向一个新的96孔深孔板中添加1.0-1.5 ml摇好的菌液（或者取摇好菌液的96孔板），加盖封口膜，3600 rpm离心10 min收集菌体，倒掉培养基，倒扣于吸水纸上除去残留的培养基（如果菌液浓度较低，可以重复集菌一次）。
2. 向收集好的细菌培养物中加入250 μ l溶液P1(请先检查是否已加入RNaseA)，加盖新的封口膜，使用漩涡混合器彻底悬浮菌体。
3. 揭去封口膜，向96孔深孔板中每孔加入250 μ l溶液P2，加盖新的封口膜，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解，瞬时离心使封口膜上的水珠落回板中。

注意：温柔混匀以防有基因组DNA污染。混匀后菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。

4. 揭去封口膜，向96孔深孔板中每孔加入350 μ l溶液P3，加盖新的封口膜，立即温和地上下翻转6-8次使其充分混匀，3600 rpm离心10 min。

注意：P3加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。

5. 将96孔过滤板和一个新的96孔深孔板叠放在一起，转移步骤4中的上清到对应的96孔过滤板中，3600 rpm离心5 min。
 6. 向上述96孔深孔板中的每孔加入15 μ l磁珠悬浮液G，抽打混匀。
 7. 将深孔板室温静置5 min，期间抽打混匀一次。
 8. 将深孔板于磁力架上静置30 sec，待磁珠完全吸附时倒掉液体。
 9. 将深孔板从磁力架上取下，每孔加入600 μ l漂洗液PW (请先检查是否已加入无水乙醇)，抽打混匀。
-

10. 将深孔板于磁力架上静置30 sec，待磁珠完全吸附时倒掉液体。

11. 重复步骤9、10，液体尽量去除干净。

12. 深孔板于磁力架上，室温晾干5-10 min。

注意：乙醇残留会抑制后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间，以免难以洗脱DNA。

13. 将深孔板从磁力架上取下，加入50-100 μ l洗脱液，涡旋混匀，室温静置5-10 min，期间涡旋混匀一次。

14. 将深孔板放置于磁力架上静置30 sec，待磁珠完全吸附时小心将DNA溶液转移并于适当条件保存。

注意：洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防DNA降解。

质粒DNA浓度及纯度检测

得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD₂₆₀值为1相当于大约50 μ g/ml 双链DNA。

OD₂₆₀/OD₂₈₀比值应为1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用ddH₂O，比值会偏低，但并不表示纯度低，因为pH值和离子存在会影响光吸收值。
