

版本号: DP140918

TIANprep Mini Plasmid Kit II

质粒小提中量试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP106

产品内容

产品组成	DP106-02 (50 preps)
平衡液BL (Buffer BL)	30 ml
溶液P1 (Buffer P1)	30 ml
溶液P2 (Buffer P2)	30 ml
溶液P3 (Buffer P3)	40 ml
去蛋白液PD (Buffer PD)	30 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	15 ml
洗脱缓冲液EB (Buffer EB)	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	300 μ l
吸附柱CP4 (Spin Columns CP4)	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 $^{\circ}$ 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。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中, 混匀后置于2-8 $^{\circ}$ C保存, 可稳定保存12个月以上。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特有新型材料，高效、专一吸附DNA，可最大限度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5-15 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	5-15 ml	5-25 µg	pBR322, pACYC及其衍生载体, pSC101及其衍生载体, SuperCos, pWE15
高拷贝	5-15 ml	15-70 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 (将试剂盒中提供的RNase A全部加入)，混匀，置于2-8°C保存。
2. 使用前先检查平衡液BL、溶液P2和P3是否出现浑浊，如有混浊现象，可在37°C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12,000 rpm (~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10 kb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°C预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
6. 实验前使用平衡液处理吸附柱，可以最大限度激活硅基质膜，提高得率。
7. 用平衡液处理过的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果。
8. 去蛋白液PD可以有效去除残留的蛋白杂质，当宿主菌为endA⁺ (TG1、BL21、HB101、ET1256、JM101等) 核酸酶含量较高的菌株时，强烈推荐去蛋白液PD。

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. 柱平衡步骤：向吸附柱CP4中（吸附柱放入收集管中）加入500 μl 的平衡液BL，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

2. 取5-15 ml过夜培养的菌液加入离心管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1 min，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。收集的菌体量以能够充分裂解为佳，菌体过多裂解不充分会降低质粒的提取效率。

3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入500 μl 溶液P1（请先检查是否已加入RNase A），使用移液器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。

4. 向离心管中加入500 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，所用时间不应超过5min，以免质粒受到破坏。如果菌液没有变清亮，可能是由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

5. 向离心管中加入700 μl 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。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心10 min，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。

6. 将上一步收集的上清液分次加入吸附柱CP4中（吸附柱放入收集管中，其容量为750-800 μl ），注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP4放入收集管中。

7. 可选步骤：向吸附柱CP4中加入500 μl 去蛋白液PD，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP4重新放回收集管中。

如果宿主菌是end A⁺宿主菌（TG1, BL21, HB101, JM101, ET12567等），这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒DNA，推荐采用此步。

如果宿主菌是endA⁻宿主菌（DH5 α , TOP10等），这步可省略。

-
8. 向吸附柱CP4中加入600 μl 漂洗液PW (请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP4放入收集管中。
 9. 重复操作步骤8。
 10. 吸附柱CP4放入收集管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)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CP4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。

11. 将吸附柱CP4置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加100-300 μl 洗脱缓冲液EB，室温放置2-5 min，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心2 min，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100 μl ，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ddH₂O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效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，再次离心。

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。电泳可能为单一条带，也可能为2到3条DNA条带，这主要与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。OD₂₆₀值为1相当于大约50 $\mu\text{g/ml}$ 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。
