

## 质粒小量抽提试剂盒

### Plasmid Mini Preparation Kit

产品规格：50次

保存条件：干燥、室温（15-25℃）保存，一年有效。

自备试剂：无水乙醇

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
1	溶液 I (悬浮液)	15 mL
2	溶液 II (裂解液)	15 mL
3	溶液 III (结合液)	20 mL
4	溶液 IV (洗涤液)	18mL (按要求加无水乙醇)
5	溶液 V (洗脱液)	3mL
6	RNase A (100mg/ml)	15μl
7	小抽质粒纯化柱	50 个
8	废液收集管	50 个
9	说明书	1 份

#### 产品简介：

本试剂盒是用于质粒DNA小量制备与纯化的试剂盒。菌体先经碱裂解法处理，再通过离心吸附柱，专一结合DNA，最后洗去杂质，高效快速提取质粒DNA，全套操作可以在30分钟之内完成。使用本试剂盒可从1-5 mL过夜培养的菌液纯化得到高达20 ug的高纯度质粒DNA (OD260/OD280 = 1.8-2.0)，可以直接用于酶切、转化、测序及PCR等。

#### 注意事项：

第一次使用前把试剂盒提供的 RNase A 全部加到溶液 I (悬浮液)中，混匀，并在瓶上做好标记。加入 RNase A 后 4℃ 存放可稳定保存 6 个月。

第一次使用前在溶液 IV (洗涤液)中按标签说明要求加入无水乙醇，混匀，并在瓶上做好标记。

温度较低时，溶液 II 和溶液 III 可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀，37℃ 水浴加热溶解，混匀后使用。溶液 II 请勿过分剧烈混匀，否则会产生大量气泡，使用后，一定要盖紧瓶盖，防止被空气中二氧化碳酸化。

本试剂盒所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。

#### 使用说明：

1. 取过夜菌1.5毫升，5000g离心1分钟收集细菌沉淀，弃上清。再重复一次，每管共收集3毫升过夜菌沉淀。

通常大肠杆菌宜用LB培养过夜(16小时左右)至OD值为2-4。建议5000g(通常为5000rpm左右)室温离心1分钟，如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密，不利于加入溶液I后散开沉淀。直接倒掉上清，再倒入约1.5毫升菌液并重复上述操作，然后倒置于吸水纸上(可用普通草纸)，使液体流尽。如果细菌密度明显偏低，可考虑使用更多菌液，再重复上述操作1-2次。对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过5毫升，对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过10毫升。过量的细菌会导致后续的裂解不充分。

2. 每管加入250微升溶液I，重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开，无可见细菌团块。

确认溶液I中已经添加了RNase A。最高速度vortex 5-10秒或更长时间，悬起沉淀。一定要充分混匀，对着光亮处观察应呈均匀的悬浊液，无明显细菌团块或絮块。如果没有vortex，可以用枪吹打沉淀使沉淀逐渐散开或用手指把沉淀弹开。

3. 每管加入250微升溶液II，轻轻颠倒离心管4-6次，使细菌完全裂解，溶液透明。

切勿vortex！vortex或其它剧烈操作会导致基因组DNA断裂，易导致最终所得质粒被基因组DNA污染。颠倒4-6次后，溶液应变得透明，无团块或絮状物。如果加入溶液I后细菌没有完全散开，那么颠倒4-6次后，可能还会有团块或絮状物。遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数3-5次，再室温放置2-3分钟，但总裂解时间不可超过5分钟。

4. 每管加入350微升溶液III，随即颠倒离心管4-6次混匀，可见白色絮状物产生。

切勿vortex！颠倒次数也不宜过多，否则易导致最终所得质粒的质量下降。

5. 最高速(13,000rpm左右)室温离心10分钟。

离心后会产生白色沉淀。离心时准备好下一步需使用的质粒纯化柱，废液收集管，并在纯化柱上做好标记。

6. 将上一步离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。最高速离心30-60秒，倒弃收集管内液体。

质粒倒入质粒纯化柱后，可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。

7. 在质粒纯化柱内加入750微升溶液IV，最高速离心30-60秒，洗去杂质，倒弃收集管内液体。

加入溶液IV后可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。

8. 再最高速离心1分钟，除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。

注意：倒弃收集管内液体后再离心，才能彻底去除微量的溶液IV。微量的溶液IV会影响质粒的质量。

9. 将质粒纯化柱置于1.5毫升离心管上，加入50微升溶液V至管内柱面上，放置1分钟。

溶液V需要直接加至管内柱面中央，使液体被纯化柱吸收。如果不慎将溶液V沾在管壁上，一定要震动离心管，使液体滑落到管底，以便被纯化柱吸收。也可以用重蒸水或MiliQ级纯水替代溶液V，但是水的pH应不小于6.5。溶液V加入后放置时间稍长，对于增加质粒产量会略有帮助。

10. 最高速离心1分钟，所得液体即为高纯度质粒。

通常所得质粒浓度为0.1-0.3mg/ml左右。如果想得到高浓度的质粒，可以采用常规的乙醇沉淀方法浓缩质粒。

北京诺梵生物科技有限公司

主页：<http://www.novinbio.com/>

电话：400-832-8698