



质粒小/中量提取纯化试剂盒

(Plasmid Mini/Midiprep Kit)

产品说明：

本试剂盒采用全新技术，收取菌体后，加入几种液体，通过2~3次离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA等杂质，直接获得高质量的质粒DNA，可应用于酶切、连接、序列测定或细胞转染等多种工作中。提取纯化过程仅需要2个离心管，方法简单，不需特殊设备，无需过柱，不用酚氯仿抽提，不用RNA酶消化；基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒，不必担心质粒DNA的丢失。提取纯化过程约需35~60分钟。

产品内容与储存方法：

名称	数量	保存条件
Buffer P1（重悬液）	15 ml	RT
Buffer P2（裂解液）	15 ml	RT
Buffer P3（中和液）	15 ml	RT
Buffer P4（助沉液）	15 ml	RT
Buffer P5（沉淀液A）	60 ml	RT
Buffer P6（沉淀液B）	2 ml	4℃

试剂盒可作100次（0.5~3 ml菌液/次）质粒小量提取纯化，或5次（30~50 ml菌液/次）质粒中量提取纯化。常温运输。保存于室温。有效期6个月。

所需其它试剂：

使用者需准备TE（Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0，超纯水配制，高压或过滤灭菌）和70%乙醇（超纯水与无水乙醇配制）。

操作方法：

小量质粒提取纯化：

- 1) 取过夜培养菌0.5~3 ml菌液，装入1.5ml或2ml离心管中，12,000 x g于室温离心2 min沉淀菌体，完全弃除上清。
- 2) 加入150 μ l Buffer P1，充分混悬震荡菌体沉淀10~15 sec，使其完全分散开，至无絮块存在。
- 3) 加入150 μ l Buffer P2，轻轻颠倒离心管3~5次，室温放置1 min，使细菌完全裂解，溶液透明。菌体较多时，可放置3~5 min，以充分裂解细菌。
- 4) 加入150 μ l Buffer P3，立即快速颠倒离心管4~6次，充分混匀，室温放置1 min，可见白色絮状物产生。菌体较多时，粘稠团块不易混匀，可倒立离心管持管口部，手指弹击管尖部2次，使其混匀成絮状。
- 5) 加入150 μ l Buffer P4，轻轻颠倒离心管3~5次，室温放置10 min。
- 6) 上述裂解液于室温 12,000 x g离心8 min，小心吸出上清，移入新的1.5 ml离心管中。沉淀团块一般附于管底或侧壁上，小心不要吸入沉淀残渣。

- 7) 加入600 μ l Buffer P5, 颠倒离心管3~5次, 充分混匀。室温放置5 min。
- 8) 于室温 12,000 x g离心8 min, 弃去上清, 倒置轻轻沥干残余液体, 管底侧壁一般可见小的近透明沉淀团块。轻轻加入1 ml 70%乙醇洗涤2次, 沥干残余液体, 沉淀风干3~5 min。
- 9) 加适量TE (20~50 μ l) 溶解沉淀。获得的DNA溶液残留有部分RNA, 但可直接应用于电泳、酶切、连接、转化及序列测定等工作中。
- 10) 50 μ l质粒溶液加入20 μ l Buffer P6 (沉淀液B), 混匀后冰上放置10 min, 12,000 x g室温离心10 min, 弃去上清液, 一般看不到沉淀团块。轻轻加入1 ml 70%乙醇洗涤两次, 沥干残余液体, 沉淀风干3~5 min。
- 11) 加适量TE (20~50 μ l) 溶解沉淀。获得的DNA溶液已基本清除RNA和其他剩余杂质, 可直接应用于细胞转染、体外转录等工作中。

中量质粒提取纯化:

- 1) 取过夜培养菌30~50 ml菌液, 装入50 ml 离心管中, 6,000 x g于室温离心5 min沉淀菌体, 完全弃除上清。
- 2) 加入3 ml Buffer P1, 充分吹打或混悬震荡菌体沉淀, 使其完全分散。
- 3) 加入3 ml Buffer P2, 轻轻颠倒离心管5~8次, 室温放置1 min, 使细菌完全裂解, 溶液透明。菌体较多时, 可放置3~5 min, 以充分裂解细菌。
- 4) 加入3 ml Buffer P3, 立即快速颠倒离心管6~10次, 充分混匀, 室温放置1 min, 可见白色絮状物产生。
- 5) 加入3 ml Buffer P4, 轻轻颠倒离心管3~5次, 室温放置10 min。
- 6) 上述裂解液于室温 12,000 x g离心10 min, 小心吸出上清, 移入新的50 ml离心管中。沉淀团块一般附于管底或侧壁上, 小心不要吸入沉淀残渣。
- 7) 加入12 ml Buffer P5, 颠倒离心管5~8次, 充分混匀。室温放置5 min。
- 8) 于室温 12,000 x g离心10 min, 弃去上清, 倒置轻轻沥干残余液体, 管底侧壁一般可见小的近透明沉淀团块。轻轻加入3 ml 70%乙醇洗涤2次, 沥干残余液体, 沉淀风干5~8 min。
- 9) 加适量TE (100~200 μ l) 溶解沉淀, 移入1.5 ml离心管中。获得的DNA溶液残留有部分RNA, 但可直接应用于电泳、酶切、连接、转化及序列测定等工作中。
- 10) 100 μ l质粒溶液加入40 μ l Buffer P6 (沉淀液B), 混匀后冰上放置10 min, 12,000 x g室温离心10 min, 弃去上清液, 一般看不到大的沉淀团块。轻轻加入1 ml 70%乙醇洗涤两次, 沥干残余液体, 沉淀风干3~5 min。
- 11) 加适量TE (100~200 μ l) 溶解沉淀。获得的DNA溶液已基本清除RNA和其他剩余杂质, 可直接应用于细胞转染、体外转录等工作中。

注意事项:

- 1) 操作中要动作轻柔, 防止机械剪切可能对DNA的损失。
- 2) 应采用pH 8.0的TE为稀释溶液, 测定OD及比值。纯水中测定的OD比值可能较低。
- 3) 最终获得的质粒溶液, OD_{260/280}比值一般在1.7~1.8的范围。如质粒DNA含量较低, OD_{260/280}比值也会较低, 但不影响转染等工作中使用。