

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，强烈推荐使用去蛋白液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。

-
- 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。
 - 重复操作步骤8。
 - 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。

- 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 $^{\circ}\text{C}$ ，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。
