

## 快捷型无内毒素质粒小提中量试剂盒

目录号: NG218S 50次  
NG218M 200次

试剂盒组成	保存	50次	200次
平衡液 BL	室温	10ml	40ml
RNaseA (10mg/ml)	-20°C	300ul	1.2ml
溶液 P1	室温	30ml	120ml
溶液 P2	室温	30ml	120ml
溶液 P4	室温	30ml	120ml
漂洗液 WB	室温	15ml	50ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml	40ml
过滤柱 FC (2ml)	室温	50个	200个
吸附柱 AC(2ml)	室温	50个	200个
2ml 收集管	室温	100个	400个

**储存条件:** 该试剂盒置于室温(15-30°C)干燥条件下, 可保存 16 个月。若溶液产生沉淀, 使用前可在 37°C水浴中预热 10min 以溶解沉淀, 不影响效果。加入 RNaseA 后的溶液 P1 应置于 2-8°C保存, 可稳定保存 6 个月。

**产品介绍:**

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术, 高效专一地结合质粒 DNA。同时采用特殊的溶液 P4 和过滤柱 FC, 可有效的去除内毒素、蛋白等杂质; 整个提取过程仅需 1 个小时, 方便快捷。适用于提取从 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。本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于转染多种细胞及各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

**注意事项:**

1. 溶液 P1 在使用前先加入 RNaseA (将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入), 混匀, 置于 2-8°C保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液 WB 中加入无水乙醇。
3. 使用前先检查平衡液 BL、溶液 P2 和 P4 是否出现浑浊, 如有混浊现象, 可在 37°C水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。
4. 注意不要直接接触溶液 P2 和 P4, 使用后应立即盖紧盖子。
5. 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 12,000rpm(~13,400×g)。
6. 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, 应加大菌体使用量, 同时按比例增加 P1.P2.P4 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。
7. 实验前使用平衡液处理吸附柱, 可以充分激活硅基质膜, 提高得率。
8. 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。

**操作步骤:** (实验前请先阅读注意事项)

**提示:** 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定量无水乙醇, 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入将 RNaseA 全部加入溶液 P1 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8°C保存。

1. 柱平衡步骤: 向吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中)加入 200µl 的平衡液 BL, 12,000rpm(~13,400×g) 离心 1min, 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 5-15ml 过夜培养的菌液加入离心管中, 12,000rpm(~13,400×g) 离心 1min, 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, 菌体量以能够充分裂解为佳, 过多的菌体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 $\mu$ l 溶液 P1 (请先检查是否已加入 RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

**注意: 请务必彻底悬浮细菌沉淀, 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解效果, 导致提取量和纯度偏低。**

4.加入 500 $\mu$ l 溶液 P2, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 使菌体充分裂解。

**注意: 温和地混匀, 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。如果未变得清亮, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。**

5.向离心管中加入 500 $\mu$ l 溶液 P4 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置 5-8 min 左右, 12,000rpm 离心 10min。

**注意: 加入溶液 P4 后应立即混匀, 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过滤柱 FC (过滤柱放入收集管中), 12,000rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心 2 min, 滤液收集在干净的 2ml 离心管中(自备)。

7.向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇,上下颠倒 混匀后转移到吸附柱 AC 中 (**吸附柱放入收集管中**)。

**注意: 过滤后滤液会损失, 根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱 AC 的最大容积为 700 $\mu$ l, 所以需要分次过柱。**

8.室温 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。

**注意: 将第 7 步中所得溶液分多次过柱, 每次均按以上条件操作。**

9. 向吸附柱 AC 中加入 600 $\mu$ l 漂洗液 WB (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 AC 放入收集管中。

**注意: 加入漂洗液 WB 后, 如果室温静置 2-5 min, 有助于更好地去除杂质。**

10.向吸附柱 AC 中加入 600 $\mu$ l 漂洗液 WB,12,000rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 1min, 倒掉收集管中的废液。

11.将吸附柱 AC 重新放回收集管中, 12,000rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 2min, 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 AC 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。**

12.将吸附柱 AC 置于一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 100-200  $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2min,12,000rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g)离心 1min 将质粒溶液收集到离心管中。

**注意: 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, 重复步骤 12。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液, 应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液体积不应少于 100  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在-20 $^{\circ}$ C,以防 DNA 降解。**