

Plasmid Miniprep Kit

质粒小提试剂盒

一、产品名称

中文名称: 质粒小提试剂盒

货号: HS357105A (50 次)

二、产品内容

货号	产品成分	规格	储存条件
HS357105A (50 次)	Buffer P1	15 mL	室温 15-30℃
	Buffer P2	15 mL	
	Buffer P3	20 mL	
	Buffer PD	12 mL	
	Buffer PW	16 mL	
	Buffer EB	10 mL	
	DNA 吸附柱	50 支	
	2 mL 收集管	50 支	
	RNase A (10mg/mL)	150 μ L	-20 $^{\circ}$ C

三、储存条件

该试剂盒置于室温 (15 - 30 $^{\circ}$ C) 干燥条件下保存, 一年有效。若溶液产生沉淀, 使用前可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中预热以溶解沉淀, 不影响效果。**第一次使用前将**

RNase A 加入 Buffer P1 中, 混匀后置于 2 - 8 $^{\circ}$ C 保存, 可稳定保存 6 个月。

单独包装的 RNase A 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

四、产品介绍

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞, 再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA。以下操作步骤适用于提取 1 - 5 mL 过夜培养的革兰氏阴性细菌培养物, 提取质粒获得量为 5 - 20 μ g。若为低拷贝质粒或大于 10 kb 的质粒, 需要扩大 3 - 5 倍菌量, 质粒获得量为 2 - 10 μ g。

纯度通常用 A_{260}/A_{280} 进行估算, A_{260}/A_{280} 比值应该在 1.7 - 1.9 之间。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 适用于各类常规分子操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译, 以及对常规传代细胞系的转染等。

五、使用前注意事项

- 操作时客户需自备无水乙醇及若干的 1.5 mL 离心管。
- 初次使用前应在 **Buffer P1** 瓶中加入整管的 **RNase A**, 混合均匀后 2 - 8 $^{\circ}$ C 保存; 在 **Buffer PD** 瓶中加入 18 mL 无水乙醇, 混合均匀; 在 **Buffer PW** 瓶中加入 64 mL 无水乙醇, 混合均匀;
- 使用前请务必检查 **Buffer P2** 和 **Buffer P3** 中是否有沉淀, 如有浑浊或沉淀现象请将其置于 37 $^{\circ}$ C 水浴直至溶液澄清即可, 不可剧烈振荡 **Buffer P2**, 以免产生大量气泡。**Buffer P2** 使用后, 应立即盖紧盖子, 避免试剂长时间与空气接触。
- 本试剂盒仅限实验室科学研究用, 为了您的健康和安全, 请穿戴好实验服和一次性手套进行操作。

六、操作步骤

使用前请先在 Buffer PD 和 Buffer PW 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 1 mL – 5 mL 过夜培养的菌液于离心管中，13 000 r/min 离心 1 min，收集细菌沉淀，弃上清。

注意：应挑取单克隆菌落到对应抗性的 LB 培养基中培养，培养时间不应超过 16 h。

2. 在离心管中加入 250 μ L 的 Buffer P1/RNase A 混合液，涡旋振荡充分悬浮细菌沉淀。

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。

3. 继续向离心管中加入 250 μ L 的 Buffer P2，轻轻上下翻转混合 6 – 10 次，使菌体充分裂解，形成透明溶液。

注意：轻轻颠倒混合，不可剧烈振荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。此时菌液应变得清亮粘稠，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。此步骤所用时间不宜超过 5 min。

4. 继续向离心管中加入 350 μ L 的 Buffer P3，温和上下翻转混合 6 – 10 次，直至形成白色絮状沉淀，然后室温静置 2 min。

注意：P3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。

5. 室温下离心 13 000 r/min，10 min。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

6. 将 DNA 吸附柱置于 2 mL 收集管中，将上一步骤离心后的上清转移到吸附柱中。室温离心 13 000 r/min，1 min，弃废液。

7. 将吸附柱重新放回 2 mL 收集管中，加入 500 μ L 的 Buffer PD（已加入无水乙醇），室温离心 13 000 r/min，1 min，弃废液。

8. 将吸附柱重新放回 2 mL 收集管中，加入 700 μ L 的 Buffer PW（已加入无水乙醇），室温离心 13 000 r/min，1 min，弃废液。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 将吸附柱重新放回 2 mL 收集管中，室温离心 13 000 r/min，2 min，弃废液。

注意：无水乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。为确保后续实验，务必空离去除无水乙醇。

11. 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管中。室温静置或超净工作台风干 5 min，以彻底挥发残余的无水乙醇。

12. 向吸附柱柱膜中央上方小心加入 30 – 100 μ L Buffer EB（此步骤请谨慎操作，吸头请勿接触柱膜，Buffer EB 经 65 $^{\circ}$ C 温浴后再加入有助于提高洗脱效率），室温静置 2 – 5 min，室温离心 13 000 r/min，1 min，洗脱液即为质粒 DNA 溶液。洗脱的 DNA 保存在 -20 $^{\circ}$ C。

注意：洗脱液的 pH 7.0 – 8.5 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 7.0 – 8.5 范围内，pH 低于 7.0 会降低洗脱效率。且 DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置 2 min，13 000 r/min，1 min 将质粒溶液收集到离心管中。

危险警告

吞咽或吸入有害。造成皮肤刺激。造成严重眼刺激。吸入可能导致过敏或哮喘症状或呼吸困难。

避免吸入粉尘/烟/气体/气雾/蒸汽/喷雾。只能在室外或通风良好处使用。戴防护手套/穿防护服/戴防护眼罩/戴防护面罩/戴呼吸面罩，如已接触或有疑虑：呼叫中毒急救中心/医生。将人转移到空气新鲜处，保持呼吸舒适体位。脱掉沾染的衣服。按当地法规处置内装物/容器。