

高纯质粒小量提取试剂盒（柱离心型）

(Plasmid Minispin HP Kit Ver.2)

产品说明:

本试剂盒在常规柱离心质粒提取技术的基础上，改进了硅基质膜材料和试剂配方，使质粒DNA获得高效、专一吸附。经过两步洗涤，可清除蛋白质、基因组DNA、RNA和其他杂质。新增基质平衡液处理步骤，可进一步提高硅胶膜的DNA吸附能力，获得稳定的质粒产量。适合于从1~3 ml培养液中提取质粒DNA。高拷贝菌液可获得质粒DNA约5~30 µg，可应用于各种常规实验如酶切、PCR、测序、连接、转化和体外转录等操作，并可用于细胞转染工作。

产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
Buffer P1 (重悬液)	20 ml	RT
Buffer P2 (裂解液)	20 ml	RT
Buffer P3 (结合液)	30 ml	RT
Buffer PE (平衡液)	30 ml	RT
Buffer PWT (洗涤液T) *	30 ml	RT
Buffer PW (洗涤液) **	20 ml	RT
Elution Buffer (洗脱液)	10 ml	RT
离心柱及套管	100 套	RT
RNase A 20 mg/ml	0.1 ml	-20℃

试剂盒可作100次质粒小量提取。常温运输，室温保存。RNase A于-20℃保存，首次使用时加入Buffer P1中混匀，置4℃保存。*Buffer PWT (洗涤液T) 在首次使用时加入异丙醇30 ml混匀。**Buffer PW (洗涤液) 在首次使用时加入无水乙醇80 ml混匀。有效期1年。

所需其它试剂:

使用者需准备加入洗涤液的无水乙醇和异丙醇。

操作方法:

- 1) 收菌:** 取过夜培养菌1~3 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) 重悬:** 加入200 µl 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) 裂解:** 加入200 µl Buffer P2，轻轻颠倒离心管3~5次，室温放置2~3 min，使细菌完全裂解，溶液透明。裂解时间不要超过5 min。
- 4) 中和:** 加入300 µl Buffer P3，轻轻颠倒离心管4~6次，充分混匀，室温放置1~5 min，可见白色絮状物产生。于室温 12,000 x g离心8 min。
- 5) 柱平衡:** 向插入套管的离心柱内加入300 µl Buffer PE，于台式离心机上高速离心30 sec，

弃去套管内废液，将离心柱插入套管。此步骤可在收菌前至中和操作过程中灵活完成。

- 6) **DNA结合:** 将中和后离心的质粒粗提物上清小心吸出，转移至经平衡液处理过的离心柱内，于台式离心机上高速离心30 sec。弃去套管内废液，再将离心柱插回套管。
- 7) **清洗:** 向离心柱内加入Buffer PWT（洗涤液T）500 μ l，高速离心30 sec，弃去套管内废液，将离心柱插回套管。
- 8) **再清洗:** 向离心柱内加入Buffer PW（洗涤液）700 μ l，高速离心30 sec，弃去套管内废液，将离心柱插回套管。再次高速离心1~2 min甩干。
- 9) **收离心柱:** 小心取出离心柱，不要沾上套管内的废液。弃去套管。
- 10) **洗脱DNA:** 将离心柱插入一个新的1.5 ml离心管，在离心柱内硅胶膜中心位置加入100 μ l Elution Buffer（洗脱液），注意不要触及硅胶膜；高速离心1 min，离心管中即得纯化的质粒DNA溶液。
- 11) 获得的质粒DNA溶液，可直接应用于后续实验中，或保存于-20 $^{\circ}$ C备用。

注意事项:

- 1) 质粒DNA溶液的含量依赖于质粒拷贝数和扩增效率。低拷贝质粒DNA溶液的含量较低。
- 2) 平衡液处理的离心柱应在处理后6小时内使用。
- 3) 如需获得高浓度质粒DNA溶液时，可减少洗脱液体积至50 μ l，但质粒DNA回收总量可能降低。