

HighYield Mini Plasmid Kit

质粒小量提取试剂盒

产品货号：A O 3 3 0 1

试剂盒组成

Component	A O 3 3 0 1 (5 0 T)	A O 3 3 0 1 (1 0 0 T)
Buffer P1	1 5 m l	2 5 m l
Buffer P2	1 5 m l	2 5 m l
Buffer N3	1 5 m l	2 5 m l
Buffer WB1	2 5 m l	5 0 m l
Buffer WB2 (concentration)	1 3 m l	2 5 m l
Buffer WB2 (concentration)	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer EB	1 0 m l	1 5 m l
RNase A (10 mg/ml)	1 5 0 μ l	3 0 0 μ l
Spin Columns AC with Collection Tubes	5 0	1 0 0

保存方法

室温（15 - 30℃）保存。

第一次使用前将RNase A加入溶液P1中，混匀后置于4℃保存。

储存环境温度低时Buffer P2中的SDS可能会析出沉淀，此时可在42℃水浴加热几分钟，重新溶解后使用。

产品介绍

本试剂盒采用碱裂法裂解细胞，再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性结合溶液中的DNA，适用于提取1 - 5 ml过夜培养的大肠杆菌。溶液包含指示剂，指示裂解、中和是否完全，实现操作的可视化，确保质粒提取的质量。特殊改进的SDS - 碱裂法缓冲液系统，与普通的提取方法相比，本试剂盒提取的质粒产量更高，更适合低拷贝质粒DNA的提取。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、体外翻译等。

注意事项（请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项）

环境温度低时先检查Buffer P2是否出现浑浊，如果有浑浊现象，可在42℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。

所有离心步骤均使用台式离心机室温下进行，转速为 $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$)。

提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

Buffer P1在使用前先加入 **RNase A** 溶液（将试剂盒提供的 **RNase A** 全部加入，终浓度 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ），混匀后 4°C 保存。如果 **Buffer P1** 中 **RNase A** 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在 **Buffer P1** 中补加 **RNase A** 即可。

第一次使用前请先在 **Buffer WB2** 瓶加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！

Buffer EB 中不含有螯合剂 **EDTA** 成分，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。

标准抽提步骤（以下离心步骤均在室温下进行）

取 $1-5\text{ ml}$ 过夜培养的菌液，加入离心管中， $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 s ，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

注意：菌液超过 1.5 ml 时，可以离心弃上清后，在同一个离心管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

向菌体沉淀中加入 $250\text{ }\mu\text{l}$ 红色 **Buffer 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。

加入 $250\text{ }\mu\text{l}$ **Buffer P2**，温和地上下翻转 $8-10$ 次使菌体充分裂解，溶液变成清亮红色，室温放置 $2-3\text{ min}$ 。

注意：温和地颠倒混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成产物中有基因组 DNA 污染。此时溶液应变成清亮的红色，所用时间不要超过 5 min ，以免质粒受到破坏。如果未变成清亮红色，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

加入 $250\text{ }\mu\text{l}$ **Buffer N3**，立即温和地上下翻转直至红色消失，此时溶液呈黄色并有絮状沉淀。 $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$) 离心 5 min ，小心取上清 ($\sim 750\text{ }\mu\text{l}$) 至新的离心管。

注意：**Buffer N3** 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果离心后上清中还有微小沉淀，不影响后续操作。

向上清中加入 0.5 倍体积异丙醇 ($\sim 375\text{ }\mu\text{l}$)，充分颠倒混匀，转移到已装入收集管的吸附柱 (**Spin Columns AC**) 中， $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 s ，弃废液。

吸附柱最大容积 $750\text{ }\mu\text{l}$ ，溶液应分为两次上柱。

向吸附柱 **AC** 中加入 $600\text{ }\mu\text{l}$ **Buffer WB2**（请先检查是否已加入无水乙醇）， $12,000\text{ rpm}$ ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 s ，弃废液。

重复操作步骤 6。

将吸附柱 **AC** 放回空收集管中， $12,000\text{ rpm}$ 离心 2 min ，弃收集管和废液。

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。

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50 - 100 μ l Buffer EB（EB提前在65℃预热可增加产量），室温放置2 min，12,000 rpm（~13,400 $\times$ g）离心1 min收集质粒溶液。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置2 min，12,000 rpm（~13,400 $\times$ g）离心1 min收集质粒溶液。如果需要质粒浓度较高，可适当减少洗脱体积，但最小体积不应小于50 μ l。若用ddH₂O做洗脱液应确保其PH值在7.0 - 8.5范围内，PH值低于7.0会降低洗脱效率。

低拷贝或大质粒（> 10 kb）提取

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，使用5 - 10 ml过夜培养物，同时按照比例增加P1、P2、N3的用量，Buffer EB应在65 - 70℃水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当的延长延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。

革兰氏阳性菌质粒提取

如果提取革兰氏阳性菌质粒，必须在裂解细胞前进行破细胞壁处理，方法如下：收集适量菌体，加入250 μ l Buffer P1充分悬浮菌体，加入溶菌酶至终浓度为10 - 20 mg/ml，37℃处理30 min左右。加入溶菌酶的浓度和处理时间可根据不同的菌株和具体试验条件进行调整。其它步骤相同。