

HighYield Mini Plasmid Kit II

质粒小提中量提取试剂盒

目录号：A O 3 3 0 2

试剂盒组成

Component	A O 3 3 0 2 (5 0 T)	A O 3 3 0 2 (1 0 0 T)
Buffer BL	1 0 m l	2 0 m l
Buffer P1	2 5 m l	5 0 m l
Buffer P2	2 5 m l	5 0 m l
Buffer N3	2 5 m l	5 0 m l
Buffer WB1	2 5 m l	5 0 m l
Buffer WB2 (concentrate)	1 3 m l	2 5 m l
Buffer WB2 (concentrate)	(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	2 0 m l
RNase A (10 mg/ml)	3 0 0 μ l	6 0 0 μ l
Spin Columns DC 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全部加入到溶液P1中（终浓度100 μg/ml），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5 - 15 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。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 rpm (~13,400×g)。

提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

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。

用平衡液处理的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果。

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 μg/ml），混匀后 4℃ 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！

标准抽提步骤

柱平衡步骤：向吸附柱 Spin Columns DC 中（吸附柱放入收集管中）加入 200 μl Buffer BL，12,000 rpm (~13,400×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）

取 5 - 15 ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，10,000 rpm (~9,500×g) 离心 1 min，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

向菌体沉淀中加入 500 μl 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，全部转移到 2 ml 离心管中以便于后续提取操作。

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 500 μl Buffer P2，温和地上下翻转 8 - 10 次使菌体充分裂解，溶液应变成清亮红色，室温放置 2 - 3 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 500 μl Buffer N3，立即温和地颠倒混匀直至红色完全消失，此时溶液呈黄色并有大量沉淀生成。12,000 rpm (~13,400×g) 离心 10 min，小心吸取上清 (~1.5 ml) 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 (~750 μl)，充分颠倒混匀，转移到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DC) 中，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min，弃废液。

吸附柱最大容积 750 μl，溶液应分多次上柱，直到所有混合液通过此吸附柱。

加入 500 μl Buffer WB1，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min，弃废液。

加入 600 μ l Buffer WB2（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，弃废液。

重复操作步骤 8。

将吸附柱 DC 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液。

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。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱 DC 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 DC 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 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（ $\sim 13,400\times g$ ）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（ $\sim 13,400\times g$ ）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 100 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。