

HighYield Midi Plasmid Kit

高产量子粒小提中量试剂盒

目录号

DNE56-01

试剂盒组成

Component	DNE56-01 (50 preps)
Buffer BL	10 ml
Buffer P1	25 ml
Buffer P2	25 ml
Buffer P4	25 ml
Buffer WB1	25 ml
Buffer WB2	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer EB	15 ml
RNase A (25 mg/ml)	100 µl
Spin Columns DC with Collection Tubes	50

保存方法

- 1、 室温（15-30°C）保存。
- 2、 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°C 保存。
- 3、 储存环境温度低时 Buffer P2 中的 SDS 可能会沉淀，可在 37°C 水浴加热 10 min，重新溶解后使用。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

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。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、转染一些常规的传代细胞等。

注意事项（请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项）

- 1) 使用前先检查平衡液 BL、Buffer P2 和 P4 是否出现浑浊，如果有浑浊现象，可在 37°C 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
- 2) 不要直接接触溶液 P2 和 P4，使用后应立即盖紧盖子。
- 3) 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)。
- 4) 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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°C 保存。
- 8) 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

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 DC 中（吸附柱放入收集管内）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）

2. 取 5-15 ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

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. 向菌体沉淀中加入 500 µl 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。

4. 向离心管中加入 500 μ l Buffer P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。
注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片断。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过 5 min，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 μ l Buffer P4，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 10 min，小心取上清至新的离心管。
注意：Buffer P4 加入后应立即混合，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. 向上清中加入 0.5 倍体积异丙醇 (\sim 740 μ l)，充分颠倒混匀，分多次 (每次不超过 720 μ l) 转移到 Onestep-Lysis[®] Columns DC 中 (吸附柱 DC 放入收集管中)，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 DC 放回收集管中。直到所有混合液通过此吸附柱。
 7. 向吸附柱 DC 中加入 500 μ l Buffer WB1，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 min，弃废液，将吸附柱 AC 重新放回收集管中。
 8. 向吸附柱 DC 中加入 600 μ l 漂洗液 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，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 AC 放回收集管中。
 9. 重复操作步骤 8。
 10. 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 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。
 11. 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 $^{\circ}$ C 预热可增加产量)，室温放置 2-5 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。
-
