

质粒小量提取试剂

(离心柱型)

产品编号	规格
Sup-081602-10	10T/盒
Sup-081602-50	50T/盒
Sup-081602-100	100T/盒

提取得率

质粒类型	菌液量	得率
低拷贝	1-5ml	3ug
高拷贝	1-5ml	20ug

产品简介

本试剂盒采用改进的菌裂解buffer系统，P1浅红色、P2蓝色、P3黄色用于实时的监测反应过程；离心柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，适合于从1-4 ml 培养过夜的大肠杆菌（DH5 α ，JM109等）菌液中抽提高达25 μ g，能够高效、专一吸附DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。提取的基因组DNA片段大，纯度高，质量稳定可靠。

一、试剂盒组成、储存条件

试剂盒组成	10 次	50 次	100 次	保存
溶液 P1	2.5ml	13ml	25ml	4°C
溶液 P2	2.5ml	13ml	25ml	室温
溶液 P3	3.5ml	18ml	35ml	室温
漂洗液 WB	3ml	15ml	30ml	室温
洗脱液 EB	1.5ml	7.5ml	15ml	室温
RNaseA (10mg/ml)	25 μ l	125 μ l	250 μ l	-20°C
吸附柱 A1	10 个	50 个	100 个	室温
2ml 收集管	10 个	50 个	100 个	室温
说明书	1 份	1 份	1 份	室温

本试剂盒室温下保存 12 个月不影响使用效果。低温条件下保存时，若溶液 P2 产生沉淀，请先将溶液 P2 室温（20-30°C）条件下放置一段时间，必要时可放 37°C 水浴中温浴 10 min，以溶解沉淀。

二、实验前准备

- 使用前，请把 RNaseA 全部加入到溶液 P1 中，混匀后再使用，4°C 保存。
- 使用前，请按下表准确加入 98-100% 的乙醇到漂洗液 WB。

组分	10 次	50 次	100 次
漂洗液 WB	3ml	15ml	30ml
乙醇	12ml	60ml	120ml

三、操作步骤（离心法）

3.1 收菌

- 取 1-4 ml 过夜培养的菌液，室温下 13,000 \times g 离心 1 min 收集菌体，尽量移除上清。菌液较多时，可以通过多次离心收集菌体。
- 加入 250 μ l 溶液 P1（含 RNaseA），涡旋振荡使菌体沉淀彻底悬浮【**红色液体变混浊，无块状物**】。

3.2 裂解

- 加入 250 μ l 溶液 P2，温和地上下翻转 4-7 次，使菌体充分裂解，室温下静置 1 min，裂解时间不要超过 3 min，此时菌液变得**深红色透亮粘稠**。

注意：此操作避免剧烈混匀，否则容易导致基因组 DNA 污染。裂解时间不宜超过 3 min，以免质粒受到破坏。如果溶液未变的清亮，则可能是由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体总量，或相应增加溶液 P1、P2、P3 的量。

3.3 中和

- 加入 350 μ l 溶液 P3，立即上下翻转 7-10 次，充分混匀【**深红色液体逐渐变成黄色，待**

紫色液体完全消失，说明中和完全】，此时会有絮状沉淀出现。

5. 室温下， $\geq 13,000\times g$ 离心2 min，此时在离心管底部形成白色沉淀。

3.4 质粒提取、纯化

6. 小心吸取上清至套有2 ml收集管的吸附柱A1中。静置1 min。室温下， $13,000\times g$ 离心1 min，倒掉收集管中的滤液。

7. 加入500 μl 漂洗液WB(使用前请检查是否已加入乙醇)，室温下， $13,000\times g$ 离心1 min，倒掉收集管中的滤液。再重复此步骤7两次。

8. 室温下， $13,000\times g$ 离心2 min，去除残留在吸附柱A1上的漂洗液。

注意：此步非常重要，吸附柱A1上残留的乙醇会影响后续的酶切、测序等实验。

9. 将吸附柱A1放在一个干净的1.5 ml离心管中，向硅胶膜中间滴加40-100 μl 洗脱液EB或去灭菌离子水，室温下静置1 min，然后 $13,000\times g$ 离心2 min。

注意：①洗脱液EB的洗脱体积应不少于40 μl ，体积过小会影响质粒的洗脱效率。

② 洗脱液的PH值对于洗脱效率有很大影响，建议使用洗脱液EB进行洗脱，也可用PH值在7-8之间的去离子水进行洗脱。

③ 为提高质粒的洗脱效率，可以将洗脱液EB或去离子水放在60-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中，预热5-8min后再使用。

10. 将质粒保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 或-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下。

四、流程图



常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。我们的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
DNA 降解	
加入 P2 颜色有浅红色变成深红色，但红色不均匀。	红色不均匀，说明加入试剂没有彻底混匀，导致局部裂解过分，核酸降解。
DNA 产量低	
加入 P1 后颜色不均匀，或者看到颗粒状物体。	加入 P1 后，使用涡旋振荡器，多次涡旋，彻底悬浮菌体。将菌液混匀有利于后续裂解。
P3 加入后，黄色中夹杂着粉红色	P3 加入后，液体充分中和的时候应是黄色，如果有粉红色夹杂其中，有可能是 P2 过期，菌液使用过量，建议减少菌液用量，或者联系更换新的 P2 溶液。
漂洗液中醇的量不够	1、请检查试剂 wash1、wash2 中的乙醇的量是否足够。
洗脱效率不够	2、增加洗脱体积和洗脱次数。由于基因组 DNA 片段大，水溶性较差。建议进行第三次洗脱以提高产量或提高洗脱液的体积。
RNA 污染	
延长 RNase A 消化时间	加入 RNase A 后的 P1，应储存 2-8℃ 的环境中，保证酶活的有效性。加入 P1 后，彻底混匀，悬浮菌体后，可等待数秒。
增加 RNase A 的用量	在原用量的前提下，增加原来的 0.1 倍的用量，同时延长酶解时间，确保 RNase A 能够完全降解 RNA。
OD260/280 或 OD260/230 比值不正常	
RNA 污染	P1 过期或者保存不当
230 负值	可以尝试漂洗液改用 70% 的无水乙醇漂洗 2 次