

版本号: DP210831

# TIANprep Mini Plasmid Kit

## 质粒小提试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP103

### 产品内容

| 产品组成                              | DP103-02<br>(50 preps) | DP103-03<br>(200 preps) |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| 平衡液BL (Buffer BL)                 | 30 ml                  | 120 ml                  |
| 溶液P1 (Buffer P1)                  | 15 ml                  | 60 ml                   |
| 溶液P2 (Buffer P2)                  | 15 ml                  | 60 ml                   |
| 溶液P3 (Buffer P3)                  | 20 ml                  | 80 ml                   |
| 去蛋白液PD (Buffer PD)                | 30 ml                  | 120ml                   |
| 漂洗液PW (Buffer PW)                 | 15 ml                  | 50 ml                   |
| 洗脱缓冲液EB (Buffer EB)               | 15 ml                  | 30 ml                   |
| RNase A (10 mg/ml)                | 150 $\mu$ l            | 600 $\mu$ l             |
| 吸附柱CP3 (Spin Columns CP3)         | 50个                    | 200个                    |
| 收集管(2 ml) (Collection Tubes 2 ml) | 50个                    | 200个                    |

### 储存条件

该试剂盒置于室温(15-30 $^{\circ}$ C)干燥条件下,可保存12个月。若溶液产生沉淀,使用前可在37 $^{\circ}$ C水浴中预热10min以溶解沉淀,不影响效果。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中,混匀后置于2-8 $^{\circ}$ C保存,可稳定保存6个月。单独包装的RNase A在室温可稳定保存12个月。

## 产品简介

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司新型材料，高效、专一吸附DNA。以下操作步骤适用于提取1-5 ml过夜培养的大肠杆菌，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。

## 提取得率

| 质粒类型 | 菌液量    | 得率                 | 质粒  |
|------|--------|--------------------|---|
| 低拷贝  | 1-5 ml | 3-12 $\mu\text{g}$ | pBR322, pACYC及其衍生载体<br>pSC101及其衍生载体,<br>SuperCos, pWE15 |
| 高拷贝  | 1-5 ml | 6-30 $\mu\text{g}$ | pTZ, pUC, pBS, pGM-T                                    |

## 注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液P1在使用前先加入RNase A (将试剂盒中提供的RNase A全部加入)，混匀，置于2-8°C保存。
2. 使用前请先检查平衡液BL、溶液P2和P3是否出现浑浊，如有混浊现象，可在37°C水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 注意不要直接接触溶液P2和P3，使用后应立即盖紧盖子。
4. 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为12,000 rpm(~13,400 $\times$ g)。
5. 提取的质质量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
6. 实验前使用平衡液BL处理吸附柱，可以充分激活硅基质膜，提高得率。
7. 用平衡液BL处理过的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果。
8. 去蛋白液PD可以有效去除残留的蛋白污染，当宿主菌为endA<sup>+</sup> (TG1、BL21、HB101、ET12567、JM系列)等核酸酶含量较高的菌株时，强烈推荐使用去蛋白液PD。

---

## 操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱CP3中（**吸附柱放入收集管中**）加入500  $\mu\text{l}$ 的平衡液BL，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（**请使用当天处理过的柱子**）
2. 取1-5 ml过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心1 min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入250  $\mu\text{l}$ 溶液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250  $\mu\text{l}$ 溶液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350  $\mu\text{l}$ 溶液P3，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。

**注意：P3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. 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中（**吸附柱放入收集管中**），注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

7. 可选步骤：向吸附柱CP3中加入500  $\mu\text{l}$ 去蛋白液PD，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3重新放回收集管中。

如果宿主菌是end A<sup>+</sup>宿主菌（TG1, BL21, HB101, JM系列, ET12567等），这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒DNA，推荐采用此步。

如果宿主菌是endA<sup>-</sup>宿主菌（DH5 $\alpha$ , TOP10等），这一步可省略。

---



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

- 向吸附柱CP3中加入600  $\mu\text{l}$ 漂洗液PW (请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。
- 重复操作步骤8。
- 将吸附柱CP3放入收集管中，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

**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CP3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CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加50-100  $\mu\text{l}$ 洗脱缓冲液EB，室温放置2 min，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min将质粒溶液收集到离心管中。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于50  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用ddH<sub>2</sub>O做洗脱液，并保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ ，以防DNA降解。为了增加质粒的回收率，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2 min，将质粒溶液收集到离心管中。

## 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、P3的用量，洗脱缓冲液EB应在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 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。