

3. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒建议接种单菌落于 5-15 毫升加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 14-16 个小时，可提取出 20-70 $\mu$ g 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应适当加大菌体使用量。
4. 得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50 $\mu$ g/ml DNA。电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。
5. 要知道质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒泳动位置不确定，是无法通过电泳知道确切大小的。
6. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，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。用水洗脱质粒应该保存在 -20 $^{\circ}$ C。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, PH 8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

## 五、操作步骤

\* 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇!

\* 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 AC6 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 $\mu$ l 的平衡液，13,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的滤液，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 毫升过夜培养的菌液，13000rpm，离心 60 秒，弃上清，收集菌体，尽可能的倒干上清。  
本操作可以用 2ml 离心管多次操作或者 15ml 离心管一次操作。
3. 用 500 $\mu$ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。  
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. 加 500 $\mu$ l 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-10 次使菌体充分裂解，直到溶液变得清亮。  
温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步。
5. 加 800  $\mu$ l 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6-10 次，室温放置 5 分钟。  
室温 13,000 rpm 离心 10 分钟，小心取上清。
6. 取上清，加入 300 $\mu$ l 的无水乙醇，轻轻混匀，不要剧烈震荡。
7. 将所得溶液分次转入分离柱 A(分离柱 A 放入收集管中)，12000 rpm 离心 1 分钟，弃掉分离柱 A，取收集管中离心得到的溶液。
8. 上一步所得上清液分次加入吸附柱 AC6 中(吸附柱 AC6 放入收集管中)，13,000 rpm (~17,900 $\times$ g) 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。
9. 加入 500  $\mu$ l 去蛋白液 PE，13,000 rpm 离心 30-60 秒，弃滤液。  
此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株

或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5  $\alpha$  等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

10. 加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!)，13,000 rpm 离心 30-60 秒，弃滤液。
11. 重复步骤 10 一次，13,000 rpm 离心 30-60 秒，弃滤液。空柱 13,000 rpm 离心 2 分钟。室温放置 3-5 分钟，除去残留乙醇。
12. 取出吸附柱 AC6，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 100-300 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好)，室温放置 2 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA，可立即用于下游分子生物学实验或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 100  $\mu$ l，体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

## 二、原理简介

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 PH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 PH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

## 三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 独有的去蛋白液配方，可以高效去除残留的核酸酶，即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除。有效防止了质粒被残留的核酸酶降解。
3. 快速，方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高，纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

## 四、注意事项 (实验前必须首先阅读这部分!)

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 溶液 P3 和去蛋白液 PE 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。