

质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量，洗脱缓冲液应在 70℃ 预热。可以适当延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。

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。OD260 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℃。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 瓶中加入指定量无水乙醇！（5 次的加入 75ml 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℃ 保存。

\* 使用前检查各试剂是否有沉淀，若有请于 37℃ 溶解，再恢复至室温后使用。

\* 溶液 P2 用后请盖紧瓶盖。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中）加入 1 毫升的平衡液，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 100-500 毫升过夜培养的菌液，8,000 rpm，离心 5-10 分钟，弃上清，收集菌体，尽可能的倒干上清。  
处理超过 50 毫升菌液可以离心弃上清后，在同一个 50ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
3. 用 9ml 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者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 9ml 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-10 次使菌体充分裂解，室温放置 4 分钟，直至溶液变得清亮。  
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，不是一定要准确的 5 分钟。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. 加 14.4ml 溶液 P3，立即轻柔地上下翻转 6-10 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。室温静置 5 分钟，室温 10,000rpm 离心 15 分钟（加大离心力可相应缩短离心时间）。  
注意：使絮状沉淀均匀分布，以便于离心。
6. 小心尽量吸取上清到新的离心管中，避免吸取到漂浮白色沉淀。加入

10ml 的无水乙醇，轻轻混匀，不要剧烈震荡。

7. 将步骤 6 所得混合溶液加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），每次转移 10ml(沿柱内壁加入，以免冲破吸附膜，下同),10,000rpm 离心 3 分钟，弃滤液；重复操作直至所有溶液全部过滤完毕。
8. 加入 10ml 去蛋白液 PE，10,000rpm 离心 5 分钟，弃掉废液。
9. 加入 10ml 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇!），10,000 rpm 离心 3 分钟，弃滤液。  
重复漂洗一次，10,000 rpm 离心 3 分钟，弃滤液。  
空柱 10,000rpm 再离心 5 分钟，除去残留乙醇。
10. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1-1.5ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 60-70℃水浴中预热），室温放置 1 分钟，13,000rpm 离心 3 分钟，收集下滤液。
11. 将上步所得滤液加入到纯化柱 ED 中(柱容 750μl，滤液可分两次过柱)，13,000rpm 离心 1 分钟。收集下滤液，下滤液中含有 DNA，可立即用于下游分子生物学实验或-20℃保存。

**注意：洗脱缓冲液 EB 组成为低浓度 Tris-HCl (pH8.0)，不影响测序和酶切反应。把水或洗脱液加热至 60℃使用时有利于提高洗脱液效率。**

## 二、原理简介

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，粗提物选择性结合离心柱，然后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. 独特内毒素清除配方，清除内毒素效果一般小于<0.1 EU/ug。
4. 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，直接可以用于转染，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. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到至少13,000rpm，带50ml转头的台式离心机。
2. 溶液 P2 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。
3. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提