

质粒大提试剂盒（沉淀法）使用说明书

产品编号：PE031

产品简介：

本试剂盒采用独特的缓冲系统，结合传统的异丙醇沉淀法，可快速获得大量高纯度的质粒 DNA。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 适用酶切、PCR、测序、连接、转化和转染等常规实验。

产品内容：

产品组成	PE031-10T	保存
RNase A 溶液	1.1 mL	2-8°C
悬浮液 I	110 mL	室温
裂解液 II	110 mL	室温
纯化液 III	110 mL	室温
促沉液 IV	2×110 mL	室温
TE	30 mL	室温
推杆型过滤柱	10 个	室温
说明书	1 份	

注：实验前请仔细阅读说明书。

储存条件：

1. 该试剂盒常温组分于室温（15-30°C）密封条件下可保存 12 个月。
2. 试剂盒内的 RNase A 溶液于 -20°C 可长期保存，4°C 可保存 12 个月。
3. 第一次使用时，将 RNase A 溶液全部加入悬浮液 I 中混匀，于 4°C 保存。

注意事项：

1. 裂解液 II 容易产生沉淀，请预先 37°C 水浴溶解至澄清状态。裂解液 II 含 NaOH，使用后请及时拧紧瓶盖，防止变质。
2. 纯化液 III 请置于 4°C 冰箱预冷。

3. 自备 70%乙醇和 50 mL 离心管。
4. 质粒的提取量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如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，同时按比例增加 I、II、III 的用量。
5. 建议 TE 在 65-70°C 水浴中预热。

操作步骤:

细胞裂解

1. 取 100-200 mL 过夜培养的菌液，分次加入同一个 50 mL 离心管中，7,500 rpm 室温离心 5-10 min，弃上清，收集菌体。为保证上清液全部弃除，可将离心管倒置在干净的吸水纸上。
2. 向菌体沉淀中加入 10 mL 悬浮液 I（确认已加入 RNase A 溶液），通过移液器吹打或涡旋震荡混匀，室温静置 3-5 min。
3. 向上述菌体悬浮液中加入 10 mL 裂解液 II，立即缓慢颠倒离心管 6-8 次，室温静置 5-10 min 左右，此时混合液为澄清状态。
(注意：为避免基因组 DNA 污染和质粒断裂，请勿剧烈震荡离心管，静置时间勿超过 10 min。)
4. 加入 10 mL 预冷的纯化液 III，立即缓慢颠倒离心管 6-8 次，冰上静置 10 min。7,500 rpm 室温离心 10 min。

质粒 DNA 纯化

1. 将离心后的上清液用推杆型过滤柱过滤，转移至新的 50 mL 离心管中。
2. 向滤液中加入 20 mL 的促沉液 IV，颠倒混匀，室温静置 10 min。
3. 7,500 rpm 室温离心 15 min（或 5,000 rpm 离心 30 min）。弃上清液（请勿触及离心管壁白色沉淀），倒置于吸水纸上沥干残余液体。
4. 加入 5 mL 70%乙醇涮洗管壁，7,500 rpm 室温离心 5 min，小心倒掉上清液（请勿触及离心管壁白色沉淀，如果白色沉淀脱落，可以再次离心），倒置于吸水纸上沥干残余液体。
5. 用 0.5-1.5 mL TE 溶解 DNA 沉淀，琼脂糖凝胶电泳检测。如需长期保存请置于-20°C。

质粒 DNA 浓度及纯度检测:

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。电泳可能为多条带，这些条带是质粒的多聚体造成的，不影响后续的酶切、转染等实验。OD₂₆₀ 值为 1 时，双链 DNA 约 50 µg/mL。

纯化的质粒 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 通常在 1.8-2.0 左右，可直接应用于分子生物学等常规操作。如溶解时不使用缓冲液，而使用 ddH₂O，比值会偏低，但并不表示纯度低，因 pH 值和离子会影响光吸收值。