

## 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。OD<sub>260</sub> 值为 1 时，双链 DNA 约 50 µg/mL。

纯化的质粒 DNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 ddH<sub>2</sub>O，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。