

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 μ 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。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μ 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 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℃ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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. 将所得上清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。
7. 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。
8. 加入 500 μ 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 α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

9. 加入 500 μ 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。
 10. 重复步骤 9 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。
 11. 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 μ 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。
 12. 将下滤液加入到纯化柱 ED 中, 室温放置一分钟, 13,000rpm 离心一分钟洗脱 DNA, 可立即用于下游分子实验或-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 50 μ 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。