

## 离心柱法质粒小提试剂盒

### 【产品介绍】

本试剂盒是基于碱裂法改良的离心柱法质粒提取试剂，用于≤10 mL LB 培养基培养的大肠杆菌中质粒的提取。所得质粒 DNA 可用于酶切、转化、PCR、测序等下游分子生物学实验。

### 【特点】

操作简便、所得质粒 DNA 纯度高，提取量大。

### 【试剂盒组成】

组分	目录号: CP-001-0 (50 次)	目录号: CP-001-1 (50 次)
重悬液 CP1	15 mL	15 mL
裂解液 CP2	15 mL	15 mL
中和液 CP3	20 mL	20 mL
洗涤液 CPW	12 mL	12 mL
洗脱液 EB	10 mL	10 mL
RNaseA (10 mg/mL)	/	150 $\mu$ L
离心柱 (含收集管)	50 个	50 个

### 【保存条件】

RNaseA 在-20 °C 中保存，试剂盒其它成分置于常温干燥处保存。

### 【操作步骤】

使用前，将 RNase A 全部加入重悬液 CP1 中，做好标记并置于 2-8 °C 保存；添加 48 mL 无水乙醇到洗涤液 CPW 中，并做好标记。

1. 在干净的 1.5 mL 离心管中加入 1mL 过夜培养的菌液，12,000×g 离心 1 min，枪头吸弃上清。如菌液量大，可分多次离心收集。
2. 在菌体沉淀中加入 250  $\mu$ L 重悬液 CP1 (含 RNase A)，振荡或枪头吹吸充分悬浮菌体，注意不应留有小的菌块。
3. 加入 250  $\mu$ L 裂解液 CP2，盖好管盖，温和地上下翻转混合 4-6 次，使菌体充分裂解，溶液由浑浊变为透亮，指示完全裂解 (不宜超过 5 min)。
4. 加入 350  $\mu$ L 中和液 CP3，盖好管盖，温和地上下翻转混合 5-6 次，肉眼可见产生大量浅黄色凝集块，室温静置两分钟。
5. 15,000×g 离心 5 min，小心吸取上清加入离心柱中。12,000×g 离心 1 min，弃流出液 (如上清体积大于 800  $\mu$ L，建议分为 2 次上柱离心)。
6. 加入 500  $\mu$ L 洗涤液 CPW (使用前确定已加入无水乙醇)，12,000×g 离心 30 s，弃流出液。

- 
7. 重复步骤 6 一次。
  8. 把离心柱放回收集管中，将空柱子于  $15,000 \times g$  离心 2 min 以便彻底去除残留的 CPW。
  9. 将离心柱置于一干净的离心管中，在超净台中开盖风干柱膜 3-5 min (CPW 中的乙醇残留可能抑制下游反应)。
  10. 在离心柱膜中央加入 30-200  $\mu\text{L}$  洗脱液 EB，静置 1 min (如需提高洗脱效率，可提前将 EB 置于 60-70 °C 水浴或金属浴中预热)。
  11.  $12,000 \times g$  离心 1 min，洗脱 DNA，所得质粒 DNA 置于-20 °C 中长期保存。

#### 【使用注意】

- 所有离心均在室温下进行。
- 为避免产物污染或降解，建议使用干净、无 DNase 污染的器械或耗材。
- 溶液使用前尽量充分混匀，同时注意避免溶液间交叉污染。
- 加入 CP2 和 CP3 后，操作一定要温和，剧烈混合会导致基因组 DNA 污染。
- 检测 CP2 是否混浊，如有混浊，可在 37 °C 水浴中加热几分钟，使其彻底溶解；使用后拧好盖子防止碱性裂解液 pH 发生变化。
- 试剂盒中离心柱 DNA 最大吸附量为 40  $\mu\text{g}$ ，质粒拷贝数高的适当减少菌液用量。
- 如质粒提取量低，可适当增加菌液量或者降低洗脱液体积。
- CP1、CP2、CP3 的用量请严格参照说明书，菌体量过大导致裂解不充分，影响质粒 DNA 的得率及纯度。