



# 普通 质粒快速小提试剂盒 (50次)

货号：HZPGK50-I

## 一、内装

产品名称	规格	用途	储存条件
RNase A(10mg/ml)	100 $\mu$ l	去除RNA	4 $^{\circ}$ C可保存3个月， -20 $^{\circ}$ C可保存6个月
C1溶液	15ml	重悬菌体	25-30 $^{\circ}$ C可保存6个月
C2溶液	15ml	裂解菌体	25-30 $^{\circ}$ C可保存6个月
C3溶液	20ml	形成沉淀	25-30 $^{\circ}$ C可保存6个月
CB溶液	11ml	漂洗，脱盐(使用前加入 44ml无水乙醇)	25-30 $^{\circ}$ C可保存6个月
EB溶液	5ml	洗脱质粒	25-30 $^{\circ}$ C可保存6个月
吸附柱	50个	结合质粒	干燥避光下保存12个月
收集管 (2ml)	50个	收集吸附柱离心后的液体	干燥避光下保存12个月

## 二、操作步骤

1.挑取菌落于3-5ml含有抗生素的LB培养基中37℃振荡培养18-24小时。

**注意：**在有氨苄抗性的LB培养基中培养建议不超过20小时；若为-80℃甘油冻存的菌液，请先涂板后挑取新的菌落进行培养。

2.收集菌液至1.5ml离心管中，12000 rpm离心2分钟，弃上清。

**注意：**菌液较多时可通过多次离心将菌体沉淀于离心管中，尽量将上清吸除干净；菌体量不宜过多，否则会造成菌体裂解不充分。

3.加入250μl C1溶液（请先加入RNase A），重悬菌体。

**注意：**建议用1ml移液器重悬菌体并充分混匀，有条件时使用涡旋振荡器彻底悬浮菌体；已加入RNase A的C1溶液应于4℃保存。

4.沿管壁加入250μl C2溶液，上下轻柔颠倒3次，室温静置3分钟。

**注意：**切忌剧烈振荡；静置时间不应超过5分钟，以免造成DNA断裂。

5.加入350μl C3溶液，上下颠倒7-8次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。

**注意：**C3溶液加入后应立即混匀，避免形成局部沉淀；切忌混匀时剧烈振荡。

6.室温12000 rpm离心10分钟，小心的将上清转移至吸附柱中（吸附柱放入收集管中）。

**注意：**离心采取最高速，转速不小于12000 rpm，时间不得小于10分钟；吸取上清时避免吸到白色沉淀，若上清中还有微小白色沉淀可再次高速离心后取上清。

7.装有上清的吸附柱室温12000 rpm离心30秒，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

8.向吸附柱中加入500 $\mu$ l CB溶液（请先加入无水乙醇），室温12000 rpm离心30秒，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

**注意：**加入的无水乙醇比例低可能会将DNA部分洗脱掉，影响质粒提取得率。

9.重复步骤8一次。

**注意：**此步骤目的是洗去吸附柱上的盐和其他离子，不应省略。

10.室温12000 rpm离心2分钟，彻底去除吸附柱中的漂洗液，丢弃收集管，将吸附柱置于一个新的离心管中。

11.开盖室温静置5分钟，向吸附柱中间部位的吸附膜滴加30-50 $\mu$ l EB溶液。

**注意：**乙醇的残留会影响后续的实验，一定要将乙醇挥发干净。

12.扣盖室温静置5分钟，室温12000 rpm离心2分钟将质粒溶液收集至离心管中。

**注意：**可将收集的质粒溶液再次加入至吸附柱中离心，也可将EB溶液温浴至70 $^{\circ}$ C后再进行洗脱，以提高质粒回收浓度；洗脱液的pH值会影响洗脱效率，若用水洗脱，应确保水的pH值在7.0-8.5范围内。

### 三、5ml菌液质粒提取得率参考表

质粒类型	质粒提取得率
高拷贝	15-25 $\mu$ g
中拷贝	10-20 $\mu$ g
低拷贝	5-10 $\mu$ g

### 四、质粒的检测

实验室常用1% 琼脂糖凝胶电泳检测质粒纯度，出现2条或3条带时可能为质粒的开环，线性，超螺旋结构。

测质粒浓度时，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值应在1.7-1.9范围内，1.8为最佳，低于1.8表明可能有蛋白质污染，大于1.9表明可能有RNA污染。