

# 质粒小提

本 Protocol 使用 **聚合美多彩质粒小提试剂盒**

M5 HiPer Multi-color Plasmid Miniprep Kit (with column)

1. 取 1~5 mL (如果是低拷贝质粒可以收集更多菌液)过夜培养的菌液, 室温 4000 rpm 离心 5 min, 尽量将上清去除干净
2. 柱平衡: 向离心吸附柱中加入 400  $\mu$ L Buffer BL, 静置 1 min, 室温下 12000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中的废液, 将离心吸附柱重新放回收集管中。请使用当天处理过的吸附柱
3. 加入 250  $\mu$ L Solution I, 旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体 **重悬均匀**, 呈现出均匀浑浊的棕红色
4. 加入 250  $\mu$ L Solution II, **温和** 颠倒混匀使菌体完全裂解, 直到溶液变成清亮、粘稠的紫红色
5. 加入 350  $\mu$ L Solution III, **立即颠倒混匀**, 可见红黄相间的沉淀物产生, 继续混匀直到完全变为澄清的黄色, 室温静置 2 min, 然后 12000 rpm 离心 5 min
6. 小心将上清液转移到离心吸附柱中, 静置 2 min, 让质粒 DNA 与吸附柱中的硅胶膜充分结合。12000 rpm 离心 30 sec, 弃收集管中滤液
7. 向吸附柱中加入 500  $\mu$ L Buffer WB1, 12000 rpm 离心 30 sec, 弃收集管中滤液

如果宿主菌是 endA-, 如 DH5 $\alpha$  或 TOP10, 此步骤可省略

如果宿主菌是 endA+, 如 TG1、BL21、HB101、JM101 等, 此步骤不可省略, 因为这些宿主菌含有大量的核酸酶, 易降解质粒。如果提取低拷贝质粒也推荐采用此步骤

8. 加入 500  $\mu$ L Buffer WB2, 室温 12000 rpm 离心 30 sec, 弃收集管中滤液。重复该步骤一次  
! WB1 和 2 为浓缩液, 初次使用按要求加入无水乙醇, 用后应立即盖紧瓶盖, 以防酒精挥发
9. 室温 12000 rpm 离心 2 min, 甩干残留液体。  
! 此步不能省略, 否则残留乙醇会影响质粒的后续使用
10. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 mL 离心管中, 加入 50  $\mu$ L 60 $^{\circ}$ C 预热的灭菌水, 室温放置 2 min。12000 rpm 离心 1 min, 离心管底溶液即质粒 DNA

修订日期 2024-04-23