

# **TIANprep N96 Plasmid Kit**

## **N96 高纯质粒DNA小提试剂盒**

(离心板型)

目录号: DP114

## 产品内容

产品组成	DP114-01 (4 plates)	DP114-02 (24 plates)
平衡液BL (Buffer BL)	240 ml	3×500 ml
溶液P1 (Buffer P1)	125 ml	3×240 ml
溶液P2 (Buffer P2)	125 ml	3×240 ml
溶液P3 (Buffer P3)	160 ml	4×250 ml
去蛋白液PD (Buffer PD)	240 ml	3×500 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	3×50 ml	2×500 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	60 ml	240 ml
TIANRed	700 ul	4×1 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.25 ml	6×1.25 ml
96孔吸附板CP3 (N96 Plate CP3(H))	4个	24个
96孔过滤板 (N96 Filtration Plate(H))	4个	24个
96孔深孔板(N96 Well Plate)	16个	96个
250 ml试剂瓶	--	1个
封口膜 (Plate Cover)	16张	96张
透气膜 (Permeation)	5张	25张

## 储存条件

该试剂盒置于室温(15-25℃)干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在37℃水浴中预热10 min, 以溶解沉淀。溶液P1加入RNase A后, 应置于2-8℃保存, 可稳定保存12个月。单独包装的RNase A可在室温保存12个月。

## 产品简介

通过96孔吸附板特异性地结合溶液中的质粒DNA。96孔吸附板中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，能够高效、专一的吸附质粒DNA，可最大限度去除蛋白及其他杂质，从而保证提取质粒的纯度。无需使用酚、氯仿等有毒有害试剂。

使用本试剂盒提取的质粒DNA可用于各种分子生物学实验，如酶切、测序、文库筛选、连接和转化等。

## 注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 96孔板细菌培养方法：将含相应抗生素的培养基加入96孔深孔板中，每孔添加1.0-1.3ml培养基且挑取单克隆摇菌，加盖透气膜封板以防污染，在220-280 rpm 37°C条件下培养20-24 h。
2. 溶液P1使用前先加入RNase A（请分批配制，每125 ml P1加入1.25 ml RNase A（10 mg/ml），可用于4板提取反应），混匀，置于2-8°C保存。
3. 每次使用前取50 ml漂洗液PW并加入200 ml无水乙醇摇匀后使用。
4. 使用前先检查平衡液BL、溶液P2和P3是否出现浑浊，如有混浊现象，可置于37°C水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。溶液P2和P3使用后应立即盖紧盖子。
5. 所有离心步骤均为室温下进行离心。
6. 提取的质粒量与细菌的培养浓度、宿主菌、质粒拷贝数等因素有关。
7. 实验前使用平衡液处理吸附板，可以最大限度激活硅基质膜，提高得率。
8. 用平衡液处理过的吸附板最好当天使用，放置时间过长会影响提取效果。

## TIANRed使用方法

TIANRed是一种颜色指示剂，用以指示整个操作的正确性，不影响任何下游实验且对人体无害。为可选试剂，客户根据需求选择是否添加。

使用方法：若选择添加，则在使用之前按TIANRed:P1=1:200进行添加，颠倒混匀至完全匀相。在使用时添加TIANRed的P1溶液为红色；添加P2之后红色完全变为紫色说明充分裂解；再添加P3溶液之后匀相状态为黄色说明中和复性充分。

---

**操作步骤：用户可以选择离心法或负压法。**

### **（一）离心法**

1. 平衡 96孔吸附板：将96孔吸附板CP3和96孔深孔板叠放在一起，向吸附板中每孔加入 500  $\mu$ l的平衡液BL，3,600 rpm( $\sim$ 2,130 $\times$ g)离心3 min，倒掉深孔板中的废液，将吸附板重新放在深孔板上。（请使用当天处理过的吸附板）。
2. 集菌步骤：向一个新的96孔深孔板中添加1.0-1.3 ml摇好的菌液（或者取摇好菌液的96孔板），加盖封口膜，3,600 rpm( $\sim$ 2,130 $\times$ g)离心10 min收集菌体，倒掉培养基，倒扣于吸水纸上除去残留的培养基（如果菌体浓度较低，可以重复集菌一次）。
3. 向每孔收集好的细菌培养物中加入250  $\mu$ l溶液P1 (请先检查是否已加入RNase A)，加盖封口膜，使用漩涡混合器彻底悬浮菌体。

**注意：若溶液P1添加TIANRed试剂，则此时为红色。**

4. 揭去封口膜，向96孔深孔板中每孔加入250  $\mu$ l溶液P2，加盖新的封口膜，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解，瞬时离心使封口膜上的水珠落回板中。

**注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免打断基因组DNA，若使用TIANRed试剂，完全混匀时颜色为紫色，若裂解不充分会有部分红色残留。混匀后菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。**

5. 揭去封口膜，向96孔深孔板中每孔加入350  $\mu$ l溶液P3，加盖新的封口膜，立即温和地上下翻转6-8次使其充分混匀。

**注意：溶液P3加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。若使用了TIANRed试剂，完全混匀应从紫色变为黄色。**

- 
6. 将96孔过滤板和一个新的96孔深孔板叠放在一起，取750  $\mu\text{l}$ 上步得到的裂解溶液转入对应的96孔过滤板中（过滤板的承载量为750  $\mu\text{l}$ ），3,600 rpm( $\sim 2,130 \times g$ )离心5 min。
  7. 将过滤液全部转入第1步准备好的96孔吸附板CP3中（**96孔吸附板CP3叠放在收集废液的96孔深孔板上**），3,600 rpm( $\sim 2,130 \times g$ )离心5 min，倒掉深孔板中的废液，将吸附板重新放在深孔板上。
  8. 可选步骤：向吸附板CP3每孔中加入500  $\mu\text{l}$ 去蛋白液PD，3,600 rpm( $\sim 2,130 \times g$ )离心5 min，倒掉深孔板中的废液，将吸附板重新放在深孔板上。

**注意：如果宿主菌是end A<sup>+</sup> 宿主菌（TG1, BL21, HB101, JM系列等），这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒DNA，强烈推荐采用此步。**

**如果宿主菌是end A<sup>-</sup> 宿主菌（DH5 $\alpha$ , TOP10等），这步可省略。**

9. 向96孔吸附板CP3每孔中加入700  $\mu\text{l}$ 漂洗液PW（**请先检查是否已加入无水乙醇**），3,600 rpm( $\sim 2,130 \times g$ )离心5 min，倒掉收集板中的废液。
10. 重复操作步骤9。
11. 将96孔吸附板CP3叠放在96孔深孔板上，置于3,600 rpm( $\sim 2,130 \times g$ )离心10 min，目的是将吸附板中残余的漂洗液去除。

**注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。**

12. 将吸附板CP3放入新的96孔深孔板中，使用排枪向96孔CP3吸附膜的中间部位悬空滴加80-100  $\mu\text{l}$ 洗脱缓冲液 TB或 ddH<sub>2</sub>O(pH $\geq 7.5$ )，室温放置5-6min，3,600 rpm( $\sim 2,130 \times g$ )离心10 min将质粒溶液收集到收集板中。

**注意：通常100  $\mu\text{l}$ 的洗脱液在洗脱后能回收平均55  $\mu\text{l}$ 的DNA产物。为增加核酸的得率，可以适当增加洗脱液的体积（比如采用120  $\mu\text{l}$ 洗脱液进行洗脱）。此外，洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用ddH<sub>2</sub>O做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ ，以防DNA降解。**

---

## （二）负压法

1. 平衡 96孔吸附板CP3：将96孔吸附板CP3放入负压装置中，每孔加入500  $\mu\text{l}$ 的平衡液BL，开启并调节负压，抽掉吸附板中的溶液。（请使用当天处理过的吸附板）
2. 以下步骤同（一）离心法中的第2-5步骤操作方法。
3. 接（一）离心法第5步骤之后，将96孔过滤板和第1步平衡好的96孔吸附板CP3叠放后置于负压装备上，过滤板每一个孔需对应吸附板的每一个孔。  
**注意：此步操作应按照各种品牌的负压装置要求进行操作。**
4. 取上步得到的裂解溶液750  $\mu\text{l}$ 左右，转入对应的96孔过滤板中（过滤板的承载量为750  $\mu\text{l}$ ），调节负压抽干溶液。
5. 可选步骤：向吸附板CP3每孔中加入500  $\mu\text{l}$ 去蛋白液PD，调节负压抽干溶液。  
**注意：如果宿主菌是end A<sup>+</sup> 宿主菌（TG1, BL21, HB101, JM系列等），这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒DNA，强烈推荐采用此步。如果宿主菌是end A<sup>-</sup>宿主菌（DH5 $\alpha$ , TOP10等），这步可省略。**
6. 向96孔吸附板CP3每孔中加700  $\mu\text{l}$ 漂洗液PW，调节负压抽干溶液。
7. 重复步骤6。
8. 使用最大负压继续抽10 min，以彻底抽干吸附材料中残余的漂洗液。若柱尾仍然含有水珠用吸水纸吸干即可。
9. 将吸附板CP3放入一个新的96孔深孔板中，使用排枪向96孔CP3吸附膜的中间部位悬空滴加80-100  $\mu\text{l}$ 洗脱缓冲液TB或ddH<sub>2</sub>O(pH $\geq$ 7.5)，室温放置5-6 min，3,600 rpm ( $\sim$ 2,130 $\times$ g)离心10 min将质粒溶液收集到深孔板中。

## DNA浓度及纯度检测

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。

DNA应在OD<sub>260</sub>处有显著吸收峰，OD<sub>260</sub>值为1相当于大约双链DNA 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、单链DNA 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值应为1.7-1.9。



---

# 浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务：

- PCR、RT-PCR系列
  - 核酸DNA、RNA分离纯化系列
  - DNA分子量标准
  - 克隆载体、感受态细胞
  - 细胞生物学产品
  - 蛋白分子量标准
  - 蛋白质染色、检测及定量相关产品
-