

TIANprep Rapid N96 Plasmid Kit

N96快速质粒DNA小提试剂盒

(离心板型)

目录号: DP115

产品内容

产品组成	DP115-01 (4 plates)	DP115-02 (24 plates)
溶液P1(Buffer P1)	125 ml	3×240 ml
溶液P2(Buffer P2)	125 ml	3×240 ml
溶液III (Buffer III)	125 ml	3×240 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孔过滤板 (N96 Filtration Plate(H))	4个	24个
96孔深孔板(N96 Well Plate)	8个	48个
封口膜(Plate Cover)	26张	150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

TIANprep Rapid N96 快速质粒DNA小提试剂盒, 适用于高通量质粒的快速制备, 可在2-3 h内完成96样本的质粒DNA提取。本试剂盒采用本公司特制的96孔过滤板和溶液III能够快速高效的提取到高纯度的质粒DNA。

本试剂盒纯化得到的质粒DNA适用于大规模测序, 同时可适用于一些常规分子生物学操作, 如酶切、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: 96深孔板中每孔添加1.0-1.3ml含相应抗生素的培养基, 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。
2. 溶液P1使用前请先加入RNaseA (请分批配制, 每125 ml P1加入1.25 ml RNase A 浓度10 mg/ml, 可用于4板提取反应), 混匀, 置于2-8°C保存。
3. 使用前先检查溶液P2和溶液III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和溶液III使用后应立即盖紧盖子。
4. 所有离心步骤均为室温下进行离心。
5. 提取质粒得率与细菌的培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

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。TIANRed为可选试剂, 客户根据需求选择是否添加。

使用方法: 在使用之前按TIANRed:P1=1:200进行添加, 颠倒混匀至完全均匀。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; 再添加溶液III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. 向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）。
2. 向96孔深孔板中每孔加入250 μ l溶液P1 (**请先检查是否已加入RNase A**)，加盖封口膜，使用旋涡混合器彻底悬浮菌体。

注意：若溶液P1添加了TIANRed试剂，则此时为红色。

3. 揭去封口膜，向96孔深孔板中每孔加入250 μ 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液体回落板中。

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。

4. 揭去封口膜，向96孔深孔板中每孔加入250 μ l 4 $^{\circ}$ C 冷却的溶液III，加盖新的封口膜，立即温和地上下翻转10次左右，充分混匀后室温放置5 min，瞬时离心使封口膜上的液体回落板中。

注意：溶液III加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。若使用TIANRed试剂，完全混匀后颜色会从紫色变为黄色。

5. (可选步骤) 将此96孔深孔板置于沸水浴中煮沸5 min。

注意：宿主菌是endA⁺(TG1、JM系列及其衍生物、HB101)时建议采用此处理步骤，防止有核酸酶的污染导致质粒难于长期保存，若宿主菌是endA⁻(DH5 α 、TOP10)，此步骤可省略掉。煮沸时间不宜超过5 min，否则易出现基因组污染。

6. (可选步骤) 将此96孔深孔板转入冰水浴中15 min左右, 充分冷却至室温。

注意: 若采用步骤5, 此步骤必须. 若不采用步骤5, 此步骤可省略掉。加热后的96孔深孔板必须采用该步骤充分冷却至低温, 否则影响异丙醇沉淀步骤。

7. 揭去封口膜, 将步骤4或步骤6中的裂解液吸入96孔过滤板中(过滤板叠放在一新的无菌96孔深孔板上), 3,600 rpm($\sim 2,130 \times g$)离心5 min。

注意: 离心之后用吸水纸完全吸干96孔深孔板板面上的水珠。若吸水纸未完全吸干板面, 则有可能导致下步骤添加异丙醇后因密闭不好使封口膜与96孔板分离。

8. 向过滤后的清液中每孔加入500 μl 室温的异丙醇, 加盖新的封口膜, 上下颠倒5-6次充分混匀, 室温3,600 rpm($\sim 2,130 \times g$)离心20 min, 小心倒掉上清, 倒扣于吸水纸上。

注意: 为防止交叉污染, 新加盖的封口膜必须完全紧密的贴在96孔深孔板上; 倒掉上清后质粒DNA为无色透明, 不易看到。

9. 向每孔中加入600 μl 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的70%乙醇, 加盖新的封口膜, 上下颠倒3-4次充分漂洗质粒DNA, 3,600 rpm($\sim 2,130 \times g$)离心5 min, 小心倒掉上清, 倒扣于吸水纸上, 风干15-20 min或真空干燥10 min。

注意: 干燥不完全时乙醇的残留会影响后续的酶反应(酶切、PCR等)实验。

10. 使用排枪向96孔深孔板中加50-100 μl 溶解液TB, 加盖新的封口膜, 涡旋1-2 min帮助质粒DNA溶解。

注意: 最适的溶解体积取决于质粒的拷贝数和用于下游实验所要的DNA浓度。

溶解液的pH值对于质粒长期保存有很大影响。若用ddH₂O做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内, pH值低于7.0会降低质粒DNA的稳定性; 且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}\text{C}$, 以防DNA降解。

(二) 负压法

1. 以下步骤同（一）离心法中的第1-6步骤操作方法。
2. 接（一）离心法第6步骤之后，揭去封口膜。将一新的无菌96孔深孔板放入负压装置内，将96孔过滤板放在负压装备的支架上。96孔过滤板每一个孔应插入96孔深孔板的每一个孔中。将深孔板中的裂解液吸到96孔过滤板中，调节负压抽干溶液。

注意：抽干之后用吸水纸完全吸干96孔深孔板板面上的水珠。若吸水纸未完全吸干板面，则有可能导致下一步骤添加异丙醇后因密闭不好使封口膜与96孔板分离。

3. 向过滤后的清液中加入500 μl 室温的异丙醇，加盖新的封口膜，上下颠倒5-6次充分混匀，室温3,600 rpm($\sim 2,130 \times g$)离心20 min，小心倒掉上清，倒扣于吸水纸上吸干板面水珠。

注意：为防止交叉污染，新加盖的封口膜必须完全紧密的贴在96孔深孔板上；倒掉上清后质粒DNA为无色透明，不易看到。

4. 向每孔中加入600 μl 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的70%乙醇，加盖新的封口膜，上下颠倒3-4次充分漂洗质粒DNA，3,600 rpm($\sim 2,130 \times g$)离心5 min，小心倒掉上清，倒扣于吸水纸上，风干15-20 min或真空干燥10 min。

注意：干燥不完全时乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

5. 使用排枪向96孔深孔板中加50-100 μl 溶解液TB，加盖新的封口膜，涡旋1-2 min帮助质粒DNA溶解。

注意：最适的溶解体积取决于质粒的拷贝数和用于下游实验所要的DNA浓度。

溶解液的pH值对于质粒长期保存有很大影响。若用ddH₂O做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低质粒DNA的稳定性；且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ ，以防DNA降解。

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
-