

少量提取质粒 DNA

1. 1.5 ml Eppendorf 管、牙签、试管等高压灭菌备用。准备溶液 STET（加溶菌酶）、异丙醇、1×TE with RNase (pH8.0)。
2. 质粒与插入片断的连接产物转化涂板，置于 37 °C 细菌培养箱中培养 12—18 h (16h 以后容易产生卫星菌落) 即可见单克隆。在灭菌的 15ml 玻璃试管中分装 2 ml LB 细菌培养液，从培养板挑取单克隆，接种于试管中，置 37 °C 摇床 (180 rpm) 培养 8-12 h。
3. 待 OD₆₀₀ 约为 0.6 时，将菌液到入灭好的 1.5 ml 离心管中，6000 g，离心 30 s。
4. 弃上清，将离心管到置于吸水纸上吸干多余的水分。
5. 加入 250 μl STET (STET: Lysozyme 10:1)，震荡重悬。
6. 置于 100 °C 中煮 1 min—1.5 min (时间视菌量而定)，17000 g 离心 5 min。
7. 用灭好菌的牙签挑去管底粘稠状蛋白。
8. 加 250 μl 异丙醇，颠倒混匀后，17000 g 离心 5 min。
9. 去上清，倒置于吸水纸上 10 min 左右 (无明显的异丙醇气味即可)。
10. 加 TE (TE: RNase 1000:1) 20-50μl (视沉淀量而定)。

中量提取质粒 DNA

1. 准备以下灭菌的材料：
1.5 ml EP 管，烧瓶，50 ml 离心管。P1、P2、P3 溶液、异丙醇、5 M 盐酸胍、1×TE (pH 8.0)、new wash、盛有 50 ml LB 培养液的容量为 200 ml 的烧瓶。
2. 从培养好的平板上挑取单克隆接种到盛有 50 ml LB 培养液的烧瓶中，置于 37 °C 摇床 (180 rpm) 培养 12-18 h。
3. 将培养好的菌液到入灭菌的 50 ml 离心管中，3100 g 离心 5 min。
4. 弃上清，控干，加 1.5 ml P1 (P1: RNase 100:1) 震荡重悬，再加 1.5 ml P2 颠倒混匀 (操作轻缓，混匀后可见溶液澄清粘稠)，最后加 1.5 ml P3 颠倒混

匀（加入 P2 之后到加入 P3 之前的反应时间不要超过 5 min）。混匀后可见絮状沉淀）。

5. 将溶液分装到 1.5 ml 管中，17000 g 离心 5 min。
6. 将每管上清均分到两管中，每管中加入 750 μ l 异丙醇，颠倒混匀多次，17000 g 离心 5 min。
7. 弃上清，控干 10 min，加 50 μ l 1 \times TE 溶解 10 min 以上。
8. 加 750 μ l 5 M 盐酸胍，混匀，上柱（Qiagen Mid Kit），9000 g 离心 25 s，弃费液，9000g 再离心 2 min，弃残留的费液。
9. 每根柱加 500 μ l new wash，9000g 离心 25 s，重复洗两次后，9000g 离心 2 min。
10. 取新的 1.5ml 离心管，将柱子放置其中，每管视情况加入一定体积的 1 \times TE（pH8.0）。

注意：每加一根柱，换一次枪头，加的时候溶液应滴于膜上。

11. 溶解 10 min 后，9000g 离心 2 min，收集溶液，测定 DNA 浓度。