

质粒小量提取试剂盒说明书

货号: D1100

规格: 50T/ 100T

保存: 常温保存, 复检期一年。

试剂盒内容:

试剂盒组成	D1100-50T	D1100-100T
RNaseA(10mg/ml)	300ul	500ul
溶液 I	15ml	30ml
溶液 II	15ml	30ml
溶液 III	20ml	40ml
漂洗液	15ml	15ml×2
洗脱液	15ml	30ml
吸附柱	50 个	100 个
收集管	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

产品简介:

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞, 根据离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA 的原理特异性提取质粒 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附 DNA, 可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。

操作步骤: (使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶体上的标签。溶液 I 在使用前先加入 RNaseA (将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入), 混匀, 置于 2-8℃保存。如非指明, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。)

- 1、取 1-5ml 细菌培养物, 12000rpm 离心 1min, 尽量吸除上清 (菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。
- 2、向留有菌体沉淀的离心管中加入 250ul 溶液 I (请先检查是否已加入 RNaseA), 使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意: 如果菌块未彻底混匀, 会影响裂解导致质粒提取量和纯度偏低。
- 3、向离心管中加入 250ul 溶液 II, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意: 混匀一定要温和, 以免污染细菌基因组 DNA, 此时菌液应变得清亮粘稠, 作用时间不要超过 5 min, 以免质粒受到破坏。
- 4、向离心管中加入 350ul 溶液 III, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 此时会出现

白色絮状沉淀。12000rpm 离心 10 min，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，尽量不要吸出沉淀。注意：溶液Ⅲ加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

5、将上一步所得上清液加入吸附柱中（吸附柱加入收集管中），室温放置 2min，12000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6、向吸附柱中加入 700ul 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

7、向吸附柱中加入 500ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

8、12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温或 50℃温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR 等。

9、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50-200ul 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

10、为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

注意事项:

1、使用前请先检查溶液Ⅱ和溶液Ⅲ是否出现混浊，如有混浊现象，可在 37℃水浴中加热几分钟，待溶液恢复澄清后再使用。溶液Ⅱ、溶液Ⅲ和漂洗液使用后应立即拧紧盖子。

2、洗脱缓冲液体积不应少于 50ul，体积过小影响回收效率;洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右(可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围)，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率，DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。

3、如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，使用 5-10ml 过夜培养物，同时按照比例增加溶液Ⅰ、溶液Ⅱ和溶液Ⅲ的用量，吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率。

4、DNA 浓度及纯度检测：得到的质粒 DNA 纯度与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。得到的 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 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50ug/ml 双链 DNA、40ug/ml 单链 DNA。OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响吸光值，但并不表示纯度低。