

超纯质粒 DNA 小量试剂盒说明书

产品组成

超纯质粒 DNA 小量试剂盒 Cat. No.	5 次样品 1019005	50 次制备 1019050	250 次制备 1019250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 离心管	5 个	50 个	250 个
RNase A	*	28 µl	140 µl
碱性蛋白酶贮存液	60 µl	0.6 ml	1.2 ml
Buffer I	1.5 ml	14 ml	70 ml
Buffer II	1.5 ml	14 ml	70 ml
Buffer III	2 ml	20 ml	100 ml
Buffer W1	3 ml	28 ml	130 ml
Buffer W2 (浓缩液)	2 ml	16 ml	100 ml
Buffer E	0.6 ml	6 ml	25 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

* 5 次样品中的 RNase A 已加入到 Buffer I 中。

产品储存

- 碱性蛋白酶贮存液请于 -20°C 储存。
- RNase A 可室温运输，收到产品后请将 RNase A 置于 2-8°C 贮存。
- 加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8°C 贮存。如果 Buffer I 储存时间超过 6 个月，需重新补加 RNase A。
- 其他试剂与物品如果储存于常温（0~30°C），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8°C，可延长产品的有效期至两年以上（2~8°C 储存的产品使用前应先使产品恢复到室温后再使用）。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本试剂盒结合了碱裂解法抽提质粒原理及柱纯化核酸技术，适合从 1~5 ml 的各种野生型菌株中提取多至 50 µg 高纯度的质粒 DNA。本产品配有特殊的碱性蛋白酶，可高效水解去除核酸酶，使得到的质粒纯度更高，更加稳定，适用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

- 无水乙醇
- 1.5 ml 离心管、移液器及吸头
- 一次性手套、纸巾及防护用品
- 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
- 旋涡振荡器

使用前准备

- 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25°C。
- 向装有 RNase A 的螺旋盖管中加入 1 ml Buffer I，混匀后再将溶液吸回到装有 Buffer I 的瓶子中，并在标签的方框中打勾作好“RNase A 已加”的标记，置于 2~8°C 保存。
- 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer W2 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
- 当室温低于 15°C 时，使用 Buffer II 前应先观察试剂是否有白色沉淀产生，如有沉淀则应于 37°C 水浴直至沉淀溶解后再使用。

操作步骤

1. 12000 rpm 离心 30 秒收集 1-5 ml 过夜培养的细菌，弃尽培养基。加入 250 μ l 已加入 RNase A 的 Buffer I，充分悬浮沉淀的细菌。

* 可用旋涡振荡器振荡或用移液器多次吹打的方法悬浮沉淀的细菌块。充分悬浮的细菌呈均一的悬浊液，不应留有可见的小菌块，否则将严重影响最后质粒 DNA 的产量。

* 若要从革兰氏阳性菌中提取质粒，需在本步骤末加入 20 μ l 浓度为 100 mg/ml 的溶菌酶溶液，旋涡振荡混匀，37°C 放置 10-30 分钟消化细菌细胞壁。

2. 加入 250 μ l Buffer II 和 10 μ l 碱性蛋白酶贮存液，温和并充分地翻转离心管 4-6 次，室温静置 10 分钟。

* 使用 Buffer II 前须确认溶液中没有可见沉淀存在；Buffer II 使用完后应盖紧瓶盖，避免与空气长期接触。

* 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒 DNA 中混有基因组 DNA。

* 当细菌裂解充分时，溶液应呈粘稠的半透明状；如果溶液达不到半透明状的效果，可能为细菌用量过多所致，须增加翻转的次数以达到细菌充分裂解的效果。

3. 加入 350 μ l Buffer III，温和并充分地翻转离心管直至上层淡蓝色溶液全部消失，形成淡黄色的沉淀。

* 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。

* 此步骤作用充分时，应有松散的淡黄色絮状沉淀产生；如果沉淀物显得厚重，可能为细菌用量过多所致，可增加翻转的次数使沉淀变得松散。

4. 13000 rpm 离心 10 分钟。

5. 将核酸纯化柱置于 2 ml 离心管中，将步骤 4 中的上清液倒入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer W1，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无需彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸上上倒扣拍击一次。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer W2，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer W2 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的质粒中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50-100 μ l Buffer E，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟。以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

* 也可用去离子水洗脱 DNA，但应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

10. 弃纯化柱，洗脱的质粒 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将质粒 DNA 储存于 -20°C 备用。