

质粒小量提取试剂盒说明书

货号: AC10997

规格: 50T/100T

保存: 常温保存, 复检期一年。(注: RNase A 以附件形式发货, 收到未使用前请-20°C保存)

试剂盒内容:

试剂盒组成	50T	100T	保存
RNase A	100 μ L	100 μ L \times 2	-20°C
溶液I	15mL	30mL	RT
溶液II	15mL	30mL	RT
溶液III	20mL	40mL	RT
漂洗液	20mL	20mL \times 2	RT
洗脱液	15mL	30mL	RT
吸附柱(含收集管)	50套	50套 \times 2	RT
说明书	1份	1份	-

产品说明:

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 可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接和转化等试验。

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(每瓶需单独加入 60mL 无水乙醇)。溶液I在使用前先加入 RNase A (将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入), 混匀, 置于 2-8°C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。

操作步骤(仅供参考):

- 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 250 μ L 溶液I(请先检查是否已加入 RNase A), 使用移液器或漩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 250 μ L 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 5min, 以免质粒受到破坏。
- 4、向离心管中加入 350 μ L 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 10min, 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、取上一步上清, 加入 0.35 倍体积无水乙醇, 充分混匀。(体积过多可分两次混合, 然后上柱)
- 6、将上一步所得上清液/混合液加入吸附柱中(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(如果为了提高得率, 可将收集管中的

液体加入吸附柱再次吸附一次)。

7、向吸附柱中加入 750 μ L 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。

8、向吸附柱中加入 700 μ L 漂洗液, 12000rpm 离心 1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。

9、12000rpm 离心 2min, 将吸附柱敞口置于室温或 50 $^{\circ}$ C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。

10、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 50-200 μ L 经 65 $^{\circ}$ C水浴预热的洗脱液, 室温放置 2min, 12000rpm 离心 1min。

11、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 $^{\circ}$ C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、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 50 μ L, 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 $^{\circ}$ C, 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 50 μ g/mL 双链 DNA、40 μ g/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。

相关产品:

AC10989 6 \times DNA Loading Buffer

AC17137 50 \times TAE 缓冲液

AC17133 5 \times TBE 缓冲液

AC12969 D2000 plus DNA Ladder

AC12973 1kb DNA Ladder

AC11938 GoldView II 型核酸染色剂(5000 \times)

相关文献:

- [1] Deguang Wu,Xuewu Guo,Jun Lu,et al. A rapid and efficient one-step site-directed deletion, insertion, and substitution mutagenesis protocol. Analytical Biochemistry. March 2013;254-258. (IF 2.275)
- [2] Jian Dong,Guanglu Wang,Cuiying Zhang,et al. A two-step integration method for seamLess gene deletion in baker's yeast. Analytical Biochemistry. August 2013;30-36. (IF 2.275)
- [3] Haigang Tan,Jian Dong,Guanglu Wang,et al. Enhanced freeze tolerance of baker's yeast by overexpressed trehalose-6-phosphate synthase gene (TPS1) and deleted trehalase genes in frozen dough. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. August 2014;41. (IF 2.533)