

质粒大提试剂盒说明书

货号：AC10998

规格：10 次

保存：常温保存，复检期一年。

试剂盒内容：

RNaseA (10mg/ml)	1ml
溶液 I	60ml
溶液 II	60ml
溶液 III	80ml
漂洗液	2×15ml
洗脱液	30ml
吸附柱	10 个
收集管(50ml)	10 个
说明书	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，一般从 50-100ml 大肠杆菌 LB 培养液中，可快速提取 200-300µg 高纯度高拷贝的质粒 DNA，提取率达 85-90%。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。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。

操作步骤：

1. 收集 50-100ml 过夜培养的菌液 11000rpm 离心 10 分钟，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 5ml 溶液 I (请先检查是否已加入 RNaseA)，使用移液器或涡旋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 5ml 溶液 II，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意：①翻转一定要温和，以免污染细菌基因组 DNA。②作用时间不要超过 5 分钟，以免质粒受到破坏。
4. 向离心管中加入 7ml 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(如菌液过多，可在此步放置 5 分钟，以尽可能的降解 RNA)。11000rpm 离心 10 分钟，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，注意尽量不要吸出沉淀。

注意：溶液 III 加入后应立即混匀，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(吸附柱放入收集管中), 室温放置 2-3 分钟, 11000rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中(如为提高得率, 可将收集管中的液体加入吸附柱再次吸附一次)。
6. 向吸附柱中加入 8ml 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 11000rpm 离心 2min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
7. 向吸附柱中加入 6ml 漂洗液, 11000rpm 离心 2min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
8. 11000rpm 离心 5min, 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 1-2ml 经 65℃水浴预热的洗脱液, 室温放置 5min, 11000rpm 离心 2min, 收集质粒溶液用于后续实验。
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 5min, 11000rpm 离心 2min。

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 500ul, 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 400-800ml 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一段时间, 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 50μg/ml 双链 DNA、40μg/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。