

高纯度质粒小提试剂盒

产品组分

组分	N1011	N1012	N1013
RNase A	150	300 μ l	600 μ l
溶液 I	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 II	15 ml	30 ml	60 ml
溶液III	20 ml	40 ml	80 ml
溶液PB	30ml	50ml	100 ml
溶液W	30 ml	30 ml×2	40 ml×3
溶液Eluent	5 ml	10 ml	20 ml
DNA纯化柱	50个	100个	200个
说明书	1份	1份	1份

- 溶液W初次使用前用无水乙醇按1: 1.5稀释，即含60%乙醇。
- 溶液 II、溶液III、溶液PB中含有碱及蛋白变性剂，请不要直接接触皮肤。
- 上述产品组分均可单独购买，详见产品索引。
- RNase A的浓度为10mg/ml。

注意事项

- 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），混匀后4℃保存，可保存6个月。
- 溶液W第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇，即30 ml溶液W中加入45 ml无水乙醇，用后立即盖紧盖子。
- 若溶液 II 出现沉淀，请于37℃保温溶解，待恢复至室温后使用。沉淀的出现不会影响质粒DNA的纯化结果。
- 注意不要直接接触溶液 II 和溶液III，使用后立即盖紧盖子。
提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如为高拷贝质粒，建议使用2 ml菌液，可提取10-15 μ g质粒。低拷贝质粒或大于10 kb质粒，建议使用5-10 ml菌液（按照比例增加溶液 I、溶液 II、溶液III 的用量），可提取4-6 μ g质粒。溶液Eluent 应在60℃水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。
- 本产品适用于革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌中的质粒DNA提取。由于革兰氏阳性菌外被一层较厚的细胞壁，会严重影响碱裂解细菌细胞的效率。因此，必须在碱裂解细胞前用溶菌酶（N9021）消化细胞壁。处理方法为：离心收集适量菌体，弃上清，加入250 μ l溶液 I，充分振荡悬浮菌体。加入溶菌酶使其终浓度为10-20 mg/ml左右，37℃处理30min。溶菌酶的浓度和处理时间可根据菌株的不同与具体的实验条件加以调整。
- 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为12,000 rpm（约13,400×g）。
- 溶液Eluent (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) 中不含EDTA，其收集的DNA片段可直接用于各种酶促反应等，不会影响后续试验。
- 为了保证回收效率，请不要使用未调整pH值的超纯水洗脱目的片段。
- 请严格遵照操作步骤操作。

产品说明

本产品采用了经典的硅胶膜及碱裂法技术，可用于质粒DNA的小量纯化。其纯化原理是碱裂解细菌后，硅胶膜高效可逆地吸附体系中的质粒DNA（高盐、低pH值），同时去除蛋白及其它杂质，被吸附的DNA在低盐、高pH值条件下再被洗脱纯化出来。一次可从1-5 ml过夜培养的菌液中提取10-40 μ g高纯度质粒DNA ($OD_{260/280} = 1.7-1.9$)，此质粒DNA可直接用于DNA序列分析以及各种酶促反应等。

质量控制

从大肠杆菌提取pGEM质粒DNA。提取的质粒DNA质量通过琼脂糖凝胶电从大肠杆菌提取pGEM质粒DNA。提取的质粒DNA质量通过琼脂糖凝胶电

保存条件

RNase A: 可室温保存一年以上。RNase A为浑浊溶液。
其他试剂: 室温保存

操作步骤

1 用1.5 ml离心管收集1-5 ml菌液。12,000 rpm离心1min，弃上清。

- 应根据所培养菌体的浓度与质粒的拷贝数，确定收集的菌液量。菌量过大可能导致溶菌不充分，纯化时会影响质粒纯度。菌体的体积与质粒拷贝数参见注意事项。

2 加入250 μ l溶液 I /RNase A混合液，漩涡剧烈振荡直至菌体完全重新悬浮。室温静置1- 2min。

- 初次使用本试剂盒时，请将RNase A全部加入到溶液 I 中，均匀混合后于4℃保存。可保存6个月。
- 不要残留细小菌块。菌体悬浮充分与否将决定质粒DNA得率的高低。
- 室温静置1-2min是为使溶液中的RNA被充分降解。

3 加入250 μ l溶液 II，轻柔地反复颠倒混匀5-6次。室温放置1-2min，使菌体充分裂解，直至形成澄清的裂解溶液。

- 若溶液 II 出现沉淀，请于37℃保温溶解。待恢复至室温后使用。沉淀的出现 不会影响质粒DNA的纯化结果。
- 不可剧烈混和，否则会使染色体DNA断裂。
- 此步骤不宜超过5min。

4 加入350 μ l溶液III，立即轻柔地反复颠倒混匀5-6次。此时会出现白色絮状沉淀。

5 12,000 rpm室温离心10min，收集上清。

6 将上清置于DNA纯化柱中，静置1-2min。

- 如果收集的上清液过多，超过DNA纯化柱容积（800 μ l），可将上清分次加入DNA纯化柱中。

7 12,000 rpm 离心1min，弃滤液。

- 此时质粒DNA被吸附于DNA纯化柱的硅胶膜上。

8 加入500 μ l 溶液PB，12,000 rpm 离心1min，弃滤液。

- 此步骤的作用是将硅胶膜上吸附的蛋白、盐等杂质洗脱，以获得高质量质粒 DNA。

9 加入500 μ l溶液W，12,000 rpm 离心1min，弃滤液。

- 溶液W初次使用前用无水乙醇按1: 1.5稀释，即含60%乙醇。

10 加入500 μ l溶液W，12,000 rpm 离心1min，弃滤液。

11 12,000 rpm离心3min，以彻底去除纯化柱中残留的液体。

12 将DNA纯化柱置于新的离心管中。向纯化柱中央处，悬空滴加50-100 μ l溶液Eluent，室温放置2min。

12,000 rpm离心1min，管底即为高纯度质粒DNA。质粒DNA于-20℃保存

- 溶液Eluent可用无菌双蒸水代替，但其pH需为8.0-8.5。溶液Eluent的加入体积视质粒拷贝数多少、用户对质粒浓度要求而定。对溶液Eluent 60℃预热，会提高提取质粒的产量。

Q&A

问：质粒DNA的收量较低，为什么？

答：一般情况下，从2 ml的LB培养基进行过夜培养的pUC118/JM109培养液中，可以纯化得到约10-15 ug的高纯度质粒。质粒DNA收量较低时，可以从以下几个方面考虑：

- 1 大肠杆菌太陈旧（在低温下的长期保存菌等），请涂布平板培养后，重新挑选新的菌落进行液体培养。
- 2 质粒拷贝数低，使用低拷贝数载体时，每次产出的质粒DNA量会降低。
- 3 确认操作过程的严密性，严格按照操作步骤进行操作。
- 4 洗脱时将灭菌超纯水或Eluent加热至60℃后使用有利于提高洗脱效率。

问：加入溶液 II 后溶菌液不澄清，为什么？

答：1 菌体量过多，溶菌不充分；

- 2 菌体沉淀悬浮不充分，在加入溶液 I 后，应使用振荡器等进行剧烈振荡使菌体沉淀充分悬浮后再做溶菌处理。

问：质粒DNA测序结果不佳，为什么？

答：1 质粒DNA纯度不好，请严格遵照实验操作要求，使用新鲜菌体培养液进行定量。

- 2 进行DNA洗脱时用灭菌的超纯水（P9021/P9022）。

- 3 DNA插入片段本身立体建构复杂，如GC rich、重复序列等，应改进测序方法。