

质粒 DNA 小量提取试剂盒

本试剂盒用于质粒的小量纯化。试剂盒采用了传统的碱裂解法，结合硅胶膜和特殊设计的制备柱技术，以提高质粒 DNA 的产量，具有高效、快速、方便等特点，全部操作只需 1 小时即可完成。使用本试剂盒可从 1-4ml LB 培养基过夜培养的菌液中纯化得到 1-20 µg 的高纯度质粒 DNA，纯化过程无需苯酚抽提、乙醇沉淀等步骤，所得质粒 DNA 溶解于 Tris buffer 或去离子水中，纯度较高，可直接用于转化。

Cat.	EK00704	EK00705	EK00725
制备次数	4 tests	50 tests	250 tests
质粒制备管	4	50	250
2ml 离心管	4	50	250
1.5ml 离心管	4	50	250
RNaseA	10 µl	30 µl	150 µl
Lysis buffer A1	2ml	15ml	75ml
Lysis buffer B1	2ml	15ml	75ml
Lysis buffer C1	2.5ml	21ml	105ml
Wash buffer A	2.8ml	28ml	135ml
Wash buffer B	2.4ml	24ml	72ml x2
Eluent solution	1ml	5ml	25ml

保存与运输：

- 1、本试剂盒可以在室温下（15-25℃）保存 1 年，若需长期保存，存放于 4℃，但有的缓冲液会出现沉淀，使用前需 37℃ 加热直至沉淀消失。
- 2、Lysis buffer A1 中加入 RNase A 后可于 4℃ 保存约 3 个月。
- 3、RNase A 可于室温下（15-25℃）保存 6 个月，长期保存需存入于 -20℃。
- 4、本试剂盒于室温下（15-25℃）运输

使用前的准备事项：

- 1、首次使用前，请将 RNase A 溶液加入到 Lysis buffer A1 中，均匀混合后 4℃ 保存。
- 2、首次使用前，按试剂瓶上指定的体积向 Wash buffer B 中添加无水乙醇。
- 3、检测 Lysis buffer B1 中是否有沉淀，如果有沉淀请将试剂置于 37℃ 水浴直至沉淀消失。不可剧烈振荡 Lysis buffer B1，否则会产生大量气泡。
- 4、Lysis buffer B1 使用后，应立即盖紧盖子，避免试剂长间与空气接触。
- 5、Lysis buffer C1 使用前请于 4℃ 预冷。
- 6、试剂中含有强碱及变性性，操作时应佩戴手套等防护用品。

操作方法：

- 1、大肠杆菌的培养。从平板培养基上挑选单菌落接种到 1-4ml 的含有抗生素的液体培养基中，37℃ 过夜培养（培养 12-16 小时，培养超过 16 小时细胞将难以裂解，质粒收量也会随之降低。）
- 2、取 1-4ml 的过夜培养菌液，12000rpm 离心 2 分钟，弃上清。
- 3、用 250 µl Lysis buffer A1（含 RNase A）充分悬浮细菌沉淀。
注：不要残留细小菌块，可以使用旋涡振荡器等剧烈振荡使菌体充分悬浮。
- 4、加入 250 µl Lysis buffer B1 轻轻上下翻转混合 5-6 次，使菌体充分裂解，形成透明溶液。
注：轻轻颠倒混合，不可剧烈振荡，此步骤不宜超过 5 分钟。
- 5、加入 350 µl 的 4℃ 预冷的 Lysis buffer C1，轻轻下下翻转混合 5-6 次，直至形成紧实絮块状，然后室

温静置 2 分钟。

- 6、室温 12000rpm 离心 10 分钟，取上清。

注：此时 4℃ 离心不利于沉淀沉降。

- 7、将试剂盒中的质粒制备管安置于 2ml 离心管上。
- 8、将步骤 6 中的上清液转移到制备管中，12000rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
- 9、将制备管放回 2ml 离心管，加入 500 μ l Wash buffer A，12000rpm 离心 1 分钟，弃滤液。
- 10、将制备管放回 2ml 离心管，加入 700 μ l Wash buffer B，12000rpm 离心 1 分钟，弃滤液；以同样方法再用 700 μ l Wash buffer B 洗涤一次，弃滤液。

注：请确认 Wash buffer B 中已经加入指定体积的无水乙醇。

- 11、重新将制备管安置于 2ml 离心管上，12000rpm 离心 2 分钟，除尽残留洗液。
- 12、将制备管安置于新的 1.5ml 的离心管上，在制备柱膜的中央处加入 50 μ l 去离子水或 Eluent solution，室温静置 1 分钟。

注：将去离子水或 Eluent solution 加热至 65℃ 使用时有利于提高洗脱效率。

- 13、12000rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA。

附录：负压法纯化质粒 DNA

负压法步骤 1-6 同上

- 7、将质粒 DNA 制备柱插到负压装置的接口上，将步骤 6 的上清转移到制备管中，开启并调节负压装置至 -25-30 英寸汞柱，缓慢吸走制备管中的溶液。
- 8、加 500 μ l Wash buffer A，使用负压装置吸尽制备管中的溶液。
- 9、加 700 μ l Wash buffer B，使用负压装置吸尽制备管中的溶液，以同样方法再用 700 μ l Wash buffer B 洗涤一次。

注：请确认 Wash buffer B 中已经加入指定体积的无水乙醇。

- 10、将制备管置于 2ml 离心管（试剂盒内提供）中，12000rpm 离心 1min。
- 11、将制备管安置于新的 1.5ml 的离心管上，在制备柱膜的中央处加入 50 μ l 去离子水或 Eluent solution，室温静置 1 分钟。

注：将去离子水或 Eluent solution 加热至 65℃ 使用时有利于提高洗脱效率。

- 12、2000rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA。