

产品组分

组分名称	组分目录号	规格 50 RXN	保存条件
RNase A (10 mg/mL)	RM30219	300 μ L	RT
Buffer BL2	RM30211	30 mL	RT
Buffer P1	RM30220	30 mL	RT
Buffer P2	RM30221	30 mL	RT
Buffer P4	RM30214	30 mL	RT
Buffer DW	RM30222	30 mL	RT
Buffer DW2	RM30154	12 mL	RT
Buffer EB2	RM30153	15 mL	RT
Spin Columns 5	RM30197	50 个	RT
Filtration Columns 1	RM30196	50 个	RT
2 mL Collection Tubes	RM30188	2 $\times$ 50 个	RT

产品说明

本试剂盒采用 SDS 和碱裂解法, 采用特殊的 Buffer P4 和过滤柱 Filtration Columns 1, 结合玻璃纤维素膜特异性吸附溶液中 DNA 的方法, 可有效的去除内毒素、蛋白等杂质, 适合从 5-15 mL 细菌培养物中提取质粒 DNA。整个提取过程仅需 1 个小时, 方便快捷。纯化的质粒 DNA 可适用于各种常规操作, 包括转染一些常规的传代细胞、酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译等。

保存温度

本试剂盒置于室温 (15-25°C) 干燥条件下保存 12 个月。低温下 Buffer P2 会有沉淀形成, 使用前需在 37°C 孵育 5-10 min 重新溶解, 摇匀后使用。当 RNase A 加入 Buffer P1 后, 可在 2-8°C 保存 6 个月。

注意事项

1. 试剂盒中提供有 RNase A, 简短离心, 然后将所有 RNase A 溶液加入 Buffer P1, 混匀后置于 2-8°C 保存, 使用前需在室温中放置一段时间, 恢复至室温后使用。
2. 第一次使用前需先在 Buffer DW2 中加入 48 mL 无水乙醇。
3. 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 (~13,400 $\times$ g)。
4. 使用前请先检查 Buffer P2 和 Buffer P4 是否出现结晶或沉淀, 如有结晶或沉淀现象, 可在 37°C 水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清。注意不要直接接触 Buffer P2 和 Buffer P4, 使用后应立即盖紧盖子。
5. 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。如果提取质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的质粒时, 应加大菌体使用量, 同时按比例增加 Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer P4 用量, 其它步骤相同。
6. 吸附柱先用柱平衡液处理, 平衡液处理过的柱子尽量当天使用, 避免放置时间过长影响后续实验效果。

自备试剂

1.5 mL 离心管, 无水乙醇, 异丙醇

操作说明

1. 柱平衡步骤: 向吸附柱 Spin Columns 5 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500 μ L 的 Buffer BL2, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理过的柱子)
2. 取 5-15 mL 过夜培养的菌液, 加入离心管中, 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1 min, 倒弃培养基, 尽量吸取, 去除全部上清。
注意: 菌液量较多可分次加入管中离心, 收集菌体, 菌体量不易过多, 否则会裂解不充分。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μ L Buffer P1 (请先检查是否已加入 RNase A), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。
注意: 彻底重悬细菌对产量很关键, 重悬后应看不到细菌团块。

4. 向离心管中加入 500 μ L Buffer P2, 温和地上下颠倒混匀 8-10 次使菌体充分裂解。
注意: 轻轻颠倒混匀, 不要剧烈震荡, 以免打断基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过 5 min, 以免质粒受到破坏。如果溶液未变得清亮, 提示可能菌量过大, 裂解不彻底, 应减少菌体量。
5. 向离心管中加入 500 μ L Buffer P4, 立即温和地上下颠倒混匀 8-10 次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀, 室温放置 10 min, 然后 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 10 min, 此时在离心管底部形成沉淀。
注意: Buffer P4 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。
6. 将上一步收集的上清液分次加入过滤柱 Filtration Columns 1 (过滤柱放入收集管中), 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 min, 然后将滤液转移至干净的 2 mL 离心管中 (自备)。
7. 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇 (加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染), 上下颠倒混匀后转移到吸附柱 Spin Columns 5 中 (吸附柱放入收集管中)。
注意: 过滤后滤液会损失, 根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱的最大容积为 700 μ L, 所以需要分次过柱。
8. 室温 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 Spin Columns 5 重新放入收集管中。
9. 向吸附柱 Spin Columns 5 中加入 500 μ L Buffer DW, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回回收管中。
10. 向吸附柱 Spin Columns 5 中加入 500 μ L Buffer DW2 (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 Spin Columns 5 放入收集管中。
11. 重复操作步骤 10 一次。
12. 12,000 rpm 离心 3 min, 去除残留的 Buffer DW2 (残留的 DW2 中的乙醇会影响下游实验)。
13. 将吸附柱 Spin Columns 5 置于新的 1.5 mL 离心管中 (自备), 加入 100-300 μ L Buffer EB2 (Buffer EB2 需在 65-70°C 水浴中预热 3-5 min) 至吸附膜的中央, 室温放置 1 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。
注意: 如果使用去离子水洗脱, 需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 7.0-8.5; 洗脱体积不应小于 100 μ L, 体积过小影响回收效率。提取的 DNA 应保存在 -20°C, 以防 DNA 降解。

DNA 浓度、纯度等测定

1. 得到的质粒 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。OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/mL DNA。电泳可能为单一条带, 也可能为 2 条或者多条 DNA 条带, 这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成, 与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。
2. 质粒 DNA 确切分子大小, 必须经过酶切线性化后, 经琼脂糖凝胶电泳结果判断。处于环状或者超螺旋状态的质粒, 泳动位置不确定, 无法通过电泳知道其确切大小。