

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℃保存）

试剂盒内容：

试剂盒组成	AC10997-50T	AC10997-100T
RNase A	200μL	400μL
溶液I	15mL	30mL
溶液II	15mL	30mL
溶液III	20mL	40mL
漂洗液I	24ml	48ml
漂洗液II	15mL	15mL×2
洗脱液	15mL	30mL
吸附柱	50 个	100 个
收集管	50 个	100 个
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。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（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 250μL 溶液I(请先检查是否已加入 RNaseA)，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 250μL 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 5 min，以免质粒受到破坏。
- 4、向离心管中加入 350μL 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 10 min，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、将上一步所得上清液加入吸附柱中(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。
- 6、向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液I(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。
- 7、向吸附柱中加入 700 μ L 漂洗液II(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 500 μ L 漂洗液II, 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I和漂洗液II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 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)