

GNM 柱式质粒 DNA 小量提取试剂盒 说明书

货 号:

HCD0706-50 (50T)

HCD0706-100 (50T*2)



一、试剂盒简介

本试剂盒的核心是 U30 柱。柱的底部有一层硅胶模惰性大分子材料，它能选择性吸附核酸物质，不吸附蛋白质，多糖和其它物质。DNA 与 U30 的结合需要一定的离子强度。抽提质粒时，细菌用常规的碱裂解，离心除去基因组 DNA。含质粒的上清液加入到 U30 柱中，经简单的洗涤步骤除去非特异性结合的杂质。所要抽提的质粒用 Elution Buffer, TE 或者水洗脱。对于高拷贝质粒而言，从 2 mL 过夜培养的菌液（OD₆₀₀ = 2.0）中能够获取超过 15 μg 的质粒 DNA。经由本试剂盒抽提所得的质粒纯度高，D260/OD280 比值通常处于 1.8 ~ 1.9 之间，OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值大于 2.0，可直接应用于转化、DNA 测序、PCR 以及酶切等后续实验。

二、储存条件及有效期

1. 在 10-30℃ 条件下储存，有效期 12 个月。
2. 产品批号、生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

| 组分名称 | HCD0706-50 (50T) | HCD0706-100 (50T*2) |
|--------------------|---------------------|------------------------|
| U30 套件 | 50 | 100 |
| Buffer I | 5 mL | 10 mL |
| Buffer II | 10 mL | 20 mL |
| Buffer III | 18 mL | 35 mL |
| Wash Buffer | 15 mL | 30 mL |
| Elution Buffer | 5 mL | 10 mL |
| RNase A (10 mg/ml) | 40 μL | 80 μL |

(a) 首次使用前，必须在 Wash Solution 瓶中加入指定倍体积的无水乙醇，充分混匀后使用。每次使用后将瓶盖拧紧，以保持 Wash Solution 中的乙醇含量。如果发现 Wash Solution 因运输或保管不当造成容量严重不准，请用量筒定容后再加入等比例体积的无水乙醇。

(b) 试剂盒中的磁珠 S 和加入 RNase A 的 Buffer I 请存放于 2-8℃，其他试剂室温保存，有效期详见包装。

四、操作步骤


试剂盒初次开启，将 RNase A 全部加入 Buffer I 中，充分混匀后在瓶身做好标记。储存于 2~8℃，有效期 6 个月。

每次使用前请检查 Buffer II 是否出现沉淀，如有沉淀，请于 37℃ 溶解沉淀，待冷却至室温后使用。

1. 在含有合适抗生素的培养基中接种目标菌株，于 37℃ 摇床进行充分振荡培养 12~16 小时。



- ✚ 菌液状态对质粒 DNA 的得率起着至关重要的作用，培养时请使用不超过容器容量 1/4 体积的培养基。
 - ✚ 处于生长平台期的菌体用于质粒抽提时得率最高，过度培养可能会导致 DNA 降解。
2. 对于高拷贝质粒，取 1~2 mL 菌液，在室温下以 10,000 rpm 离心 2 min 收集菌体，吸净上清液。
 - ✚ 对于高拷贝质粒，从 2 mL 过夜培养的菌液中通常可以获得超过 15 μg 的质粒 DNA，不建议使用更大的菌液量。
 3. 向菌体沉淀中加入 100 μL Buffer I，通过吸打或振荡使其彻底悬浮菌体。
 - ✚ Buffer I 在首次使用时，请检查是否已加入 RNase A。
 - ✚ 务必彻底悬浮菌体，否则会影响得率和质量。
 4. 加入 200 μL Buffer II，立即温和颠倒离心管 5~10 次进行混匀，在室温下静置 3~5 min 直至完全裂解。
 - ✚ 裂解时间与菌量相关，菌量多时应适当延长时间，最长不能超过 5 min。
 - ✚ 如果同时操作多个样品，每加入一管就混匀一管，不要采用全部加入后一起混匀的方法，计时从第一管样品加入时开始。
 - ✚ 混匀时，动作要温和，若剧烈震荡，可能会使基因组 DNA 被打断并混杂在质粒中。
 5. 加入 350 μL Buffer III，立即温和颠倒离心管 5~10 次充分混匀。
 - ✚ 如果同时操作多个样品，每加入一管就混匀一管，不要采用全部加入后一起混匀的方法。
 - ✚ 如果起始菌液较多，混匀后可在室温下静置 5 min 以彻底去除 RNA。
 6. 在离心机以最大转速 ($\geq 12,000$ rpm) 离心 5~10 min，将上清全部小心移入吸附柱，9,000 X g 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
 - ✚ 吸附柱的最大有效容积为 750 μL ，如果裂解液较多，可以重复该步骤直到至所有裂解液流过吸附柱。
 7. 向吸附柱中加入 500 μL Wash Buffer，9,000 X g 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
 - ✚ Wash Solut ion 首次使用前请检查是否已加入正确量的无水乙醇
 8. 重复以上步骤一次。
 9. 将空吸附柱和收集管放入离心机，9,000 X g 离心 1 min。
 - ✚ 此步绝不可省略，否则残余的乙醇会严重影响得率和后续实验。
 10. 在吸附膜中央加入 50~100 μL Elution Buffer，室温静置 1~2 min，9,000 X g 离心 1 min。将所得到的质粒 DNA 溶液置于 -20°C 保存或用于后续试验。
 - ✚ 将 Elution Buffer 预热至 60°C 可以进一步提高得率。
 - ✚ 如果质粒 > 8 kb，加入 Elut ion Buffer 后，在 $37-60^{\circ}\text{C}$ 温浴 2 分钟可以显著提高得率。

 使用小于 40 μL 的洗脱液可以得到浓度更高的 DNA，但得率显著降低。

五、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。

