

六、纯化效果检测

- 1、提取后得到的产物可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度和纯度。
- 2、DNA 在 260nm 处有吸收峰，OD260 为 1 时大概相当于 50 μ g/ml 双链 DNA，40 μ g/ml 单链 DNA。
- 3、核酸浓度 (μ g/ml) = OD260 $\times$ 50 $\times$ 稀释倍数。
- 4、OD260/OD280 的值应该为 1.7 ~ 2.0。

七、常见问题分析及建议处理方法

- 1、RNA 残留。
 - 1) Buffer GS1 没加 RNase A: 将 RNase A 加入溶液 Buffer GS1。
 - 2) Buffer GS1 中 RNase A 失活: Buffer GS1 加入 RNase 后于 4℃ 保存。
- 2、提取率低。
 - 1) 细菌培养过久: 培养时间最好不要超过 16 h。
 - 2) 质粒拷贝数低: 加大菌的用量，并根据实际情况按比例加大溶液 GS1、GS2、GS3 的用量。
 - 3) 菌量过少，浓度过低: 加大菌液用量。
 - 4) 菌体重悬不充分: 加 Buffer GS1 后充分重悬。
 - 5) Buffer W1、Buffer W2 中没有加入无水乙醇: 确保溶液 Buffer W1、Buffer W2 加入无水乙醇。
 - 6) 洗脱液使用不当: 确保使用试剂盒提供的洗涤液。
 - 7) 洗脱不充分: 确保足够洗脱时间和 Elution buffer 用前 37 ~ 65℃ 预热。
 - 8) 电泳缓冲液 pH 过高: 确保待测样品电泳时使用新鲜缓冲液。

质粒 DNA 小量提取试剂盒

GV-Plasmid DNA Mini Extraction Kit

Cat #: GV-MN-P-50/GV-MN-P-100

产品规格: 50T/100T

保存与运输: 收到试剂盒，请按照标签要求与相应条件保存。

本试剂盒采用改进的 SDS 碱裂解法，利用硅基质膜选择性地吸附 DNA 的方法达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适合于从 1 ~ 5ml 培养过夜的细菌培养物中提取多至 20 μ g 高纯度的质粒 DNA，用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、储存、稳定性

成分	50T	100T	注意事项
RNase A	0.5 ml	1 ml	-20℃
Buffer GS1	13 ml	26 ml	
Buffer GS2	13 ml	26 ml	
Buffer GS3	18 ml	36 ml	
Buffer BL	13ml	26ml	For plasmid Gel Extraction/DNA Clean
Buffer W1	6 ml	12 ml	Add 24ml(50T)/48 ml (100T)ethanol,For DNA washing
Buffer W2	6 ml	12ml	Add 24ml(50T)/48 ml (100T)ethanol,For DNA washing
Elution buffer	6 ml	12ml	For DNA Elute
Spin Columns	50	100	Max adsorption up to 20 μ g each
1.5ml Tubes	50	100	
Handbook	1	1	

RNase A: 10mg/ml, 未打开包装情况下, 室温可保存 6 个月, 长期储存于 -20℃。

Buffer GS1: 悬浮液。加入 RNaseA 后, 混匀, 4℃贮存。

Buffer GS2: 裂解液 (含 SDS/NaOH), 室温密闭贮存。

Buffer GS3: 中和液, 室温密闭贮存。

Buffer BL: 平衡液, 平衡液的加入能够激活硅基质膜, 改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性, 专一吸附 DNA 的作用, 同时还可消除高温 / 潮湿或其他不良环境因素对吸附柱造成的影响。

Buffer W1: 去蛋白液, 第一次使用前按照试剂瓶上指定体积加入无水乙醇, 室温密闭贮存。

Buffer W2: 去盐液, 第一次使用前按照试剂瓶上指定体积加入无水乙醇, 颠倒混匀, 室温密闭贮存。

Elution buffer: 10mM Tris-HCl, pH8.0。室温密闭贮存。

二、注意事项

- 1、DNA 呈酸性, 建议在 10mM Tris-HCl, pH8.0 洗脱液中保存
- 2、用平衡液处理过的柱子最好当天使用, 放置时间过长会影响效果
- 3、BufferGS2, Buffer GS3, Buffer BL 含有刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。

三、产品特点

- 1、快速: 操作简单, 一小时内可完成。
- 2、操作可视化: 溶液包含指示剂, 指示裂解、中和是否完全, 可根据颜色变化调整裂解中和时间, 保证质粒提取质量。

四、实验前试剂准备

- 1、第一次使用时将 RNase A 全部加入到 Buffer GS1 中, 之后试剂 4℃保存。
- 2、第一次使用前 Buffer W1 和 Buffer W2 中按照试剂瓶上指定量加入无水乙醇。
- 3、使用前, 检查 Buffer GS2 是否出现沉淀, 若有沉淀, 应于 37℃温浴溶解并冷却至室温后再使用。
- 4、将 Elution buffer 或双蒸水加热至 65℃, 有利于提高洗脱效率。

五、操作步骤

- 1、离心柱预处理: 在离心柱中加入 200 μ l Buffer BL, 12000rpm 离心 1min, 去掉收集管中的平衡液。
- 2、收集 1 ~ 5 ml 菌液, 12,000 rpm 离心 1 min, 吸干上清。
注: 尽量除尽上清, 否则可能影响质粒纯度
- 3、向菌体中加入 250 μ l BufferGS1 (使用前检查是否已经加入 RNase A), 旋涡振荡重悬菌体, 直至无菌块存在。
- 4、向离心管中加入 250 μ l Buffer GS2, 温和颠倒混匀 4 ~ 6 次, 此时溶液变为清亮粘稠的红色, 若未变清亮则裂解不完全, 继续混匀至溶液完全变为清亮的红色。所用时间不超过 2 min。
注: 混匀时用力不宜过度, 以免基因组污染, 看到溶液变粘变澄清即可。
- 5、加入 350 μ l Buffer GS3, 马上反复颠倒混匀 4 ~ 6 次。此时可见大量白色絮状物。静置 2min 以充分中和溶液。
注: 加入 GS3 彻底混匀后, 溶液恢复成无色, 可见大量白色絮状沉淀。若白色沉淀中夹杂红色则为中和不完全, 需要继续混匀至溶液无色。
- 6、12,000 rpm 离心 10 min, 将上清转移至离心柱中, 静置 2min。
注: 此时离心柱置于收集管中, 勿将沉淀倒入离心柱中。
- 7、12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
注: 此时 DNA 被吸附于离心柱的硅基质膜上。
- 8、向离心柱中加入 500 μ l Buffer W1 (使用前加入无水乙醇), 静置 1 ~ 2min, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
注: 目的是将膜上的蛋白等杂质洗脱。
- 9、向离心柱中加入 500 μ l Buffer W2 (使用前加入无水乙醇), 静置 1 ~ 2min, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
注: 目的是将膜上的盐等杂质洗脱。
- 10、12,000 rpm 再次离心 2 min 以甩干剩余液体。
注: 主要是去掉残余酒精, 以利 DNA 溶解。
- 11、将离心柱置于新的离心管中, 室温敞盖离心管盖放置 5 ~ 10 min, 向吸附膜的中间部位加入 50 ~ 100 μ l Elution buffer, 室温放置 2 min, 12,000rpm 离心 2 min, 管底即为质粒 DNA。