



质粒快速提取试剂盒

产品编号: NEP011-1

产品规格: 50T

产品简介:

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 细菌培养物 (OD_{600} : 0.6~0.8) 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。

组成:

成分	规格	注意事项
RNase A	0.5 ml	-20℃ 保存
溶液 A	13 ml	
溶液 B	13 ml	室温低时可能有沉淀, 50℃ 加热溶解
溶液 C	18 ml	
溶液 D	6 ml	用前加入 24 ml 无水乙醇, 充分混匀
溶液 E	6 ml	用前加入 24 ml 无水乙醇, 充分混匀
溶液 F	6 ml	TE buffer
离心柱	50 个	单个最大吸附量 20 μ g

实验前试剂准备

溶液 D 中加入 24 ml 无水乙醇

溶液 E 中加入 24 ml 无水乙醇

第一次使用时将 RNase A 全部加入到溶液 A 中, 之后试剂 4℃ 保存

储存条件:

本试剂盒所有试剂均常温保存, 避免阳光、紫外线直射。

步骤:

1、用 1.5 ml 离心管收集 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。

2、将 RNase A 全部加入到溶液 A 中 (**加完 RNase A 后 4℃ 保存**)。吸取 250 μ l 溶液 A 加入到含有菌体的离心管中, 漩涡振荡重悬菌体, 直至无菌块存在。

3、加入 250 μ l 溶液 B, 温和颠倒混匀 4~6 次, 至溶液清亮即可进行下一步操作。所用时间不超过 2 min。

注: 混匀时用力不宜过度, 看到溶液变粘变澄清即可。

4、加入 350 μ l 溶液 C, 马上反复颠倒混匀 4~6 次。静置 2 min 以充分中和溶液。

注: 此时可见大量白色絮状物。

5、12,000 rpm 离心 10 min。



6、将上清置于离心柱中，静置 2 min。

注：此时离心柱置于收集管中，忽将沉淀倒入离心柱中。

7、12,000 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、加入 500 μ l 溶液 D（使用前加入 24ml 无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。

注：目的是将膜上的蛋白质、盐等杂质洗脱。

9、加入 500 μ l 溶液 E（使用前加入 24ml 无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。

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、将离心管柱置于新的离心管中，室温敞离开心管盖放置 5-10 min，向吸附膜的中间部位加入 50~100 μ l 溶液 F，室温放置 2 min，12,000rpm 离心 2 min，管底即为质粒 DNA。

注：溶液 F 可用无菌双蒸水代替（pH $\geq$ 7.5），加入体积视质粒拷贝数多少、用户对质粒浓度要求而定。

TE 适合质粒的长期保存，但可能抑制各种酶活性，故视具体情况选择水或 TE。

纯化效果检测：

质粒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。

DNA 在 260nm 处有吸收峰，检测时应该使 OD₂₆₀ 值在 0.1 到 1.0 之间数值较准确。OD₂₆₀ 为 1 时大概相当于 50 μ g/ml 双链 DNA，40 μ g/ml 单链 DNA。

核酸浓度（ μ g/ml）=OD₂₆₀×50×稀释倍数。

OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值应该为 1.7~2.0。

常见问题分析：

常见问题	可能原因	建议
RNA 残留	溶液 A 没加 RNase A	将 RNase A 加入溶液液 A
	溶液 A 中 RNase A 失活	溶液 A 加入 RNase 后于 4℃ 保存
提取率低	细菌培养过久	培养时间最好不要超过 16 h
	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 A、B、C 的用量。
	菌量过少，浓度过低	加大菌液用量
	菌体重悬不充分	加溶液 A 后充分重悬
	溶液 D,E 中没有加入无水乙醇	确保溶液 D,E 中加入无水乙醇
	洗脱液使用不当	确保使用试剂盒提供的洗涤液
	洗脱不充分	确保足够洗脱时间和溶液 F 用前 50℃ 预热
	电泳缓冲液 pH 过高	确保待测样品电泳时使用新鲜缓冲液