

质粒小量提取试剂盒

货号: AD1100

规格: 50T/100T

试剂盒内容:

试剂盒组成	AD1100-50T	AD1100-100T
RNase A	300ul	500ul
溶液 I	15ml	30ml
溶液 II	15ml	30ml
溶液 III	20ml	40ml
漂洗液	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:

- 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250ul溶液 I (请先检查是否已加入RNaseA), 使用移液器或旋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250ul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350ul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700ul漂洗液(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500ul漂洗液，12000rpm离心1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

8、12000rpm离心2min，将吸附柱敞口置于室温或50℃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。

9、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50-200ul经65℃水浴预热的洗脱液，室温放置2min，12000rpm离心1min。

10、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℃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和漂洗液使用后应立即拧紧盖子。

2、洗脱缓冲液体积不应少于50ul，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℃，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50ug/ml双链DNA、40ug/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。

相关产品:

<i>AD1010</i>	<i>6×DNA Loading Buffer</i>
<i>AT1060</i>	<i>50×TAE 缓冲液</i>
<i>AT1050</i>	<i>5×TBE 缓冲液</i>
<i>AM1070</i>	<i>D2000 plus DNA Ladder</i>
<i>AM1400</i>	<i>1kb DNA Ladder</i>
<i>AG8142</i>	<i>GoldView II型核酸染色剂(5000×)</i>