上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

质粒大量提取试剂盒

货号：R33164

规格：10T

保存温度：-20℃保存，有效期 12 个月。

产品内容：

试剂盒组成	R33164- 10T	保存
RNase A	300μL*2	-20℃
溶液 I	60mL	RT
溶液 II	60mL	RT
溶液III	80mL	RT
漂洗液	20mL*2	RT
洗脱液	30mL	RT
吸附柱（含收集管）	10 套	RT
收集管	10 个	RT
说明书	1 份	-

产品简介：

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。一般从 50-100mL 大肠杆菌 LB 培养液中，可快速提取 200-300μg 高纯度高拷贝的质粒 DNA，提取率达 85-90%。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（每瓶需单独加入 60mL 无水乙醇）。溶液 I 在使用前先加入 RNase A（将试剂盒中提供的 RNase A 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 50-100mL 细菌培养物，11000rpm 离心 10min，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 5mL 溶液 I (请先检查是否已加入 RNase A），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 5mL 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 5min，以免质粒受到破坏。

4、向离心管中加入 7mL 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，此时会出现白色絮状沉淀(如菌液过多，可在此步放置 5 分钟，以尽可能的降解 RNA)。11000rpm 离心 10 分钟，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，注意尽量不要吸出沉淀。注意：溶液III加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中仍有少量絮状沉淀，可再次离心取上清。

5、取上一步上清，加入 0.6 倍体积无水乙醇，充分混匀。（体积过多可分两次混合，然后上柱）

6、将上一步所得上清液/混合液加入吸附柱中(吸附柱加入收集管中)，室温放置 2-3min，11000rpm 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中(如果为了提高得率，可将收集管中的液体加入吸附柱再次吸附一次)。

7、向吸附柱中加入 8mL 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，11000rpm 离心 2min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

8、向吸附柱中加入 6mL 漂洗液，11000rpm 离心 2min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

9、11000rpm 离心 5min，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。

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 1-2mL 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 5min，11000rpm 离心 2min。

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 5min，11000rpm 离心 2min。

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、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 50μL，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 可用琼脂糖疑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。