

质粒提取试剂盒-小量

说明书

组分 \ 编号	ZD-TG-32-50
mini 离心柱	50 个/包×1
1.5ml 离心管	50 个/包×1
溶液 PA	20ml/瓶×1
溶液 PB	20ml/瓶×1
溶液 PC	20 ml/瓶×1
RNase A	2.5mg/管×1
溶液 TE	12ml/瓶×1
说明书	1 份

产品介绍

重鼎生物是Takegene[®]无胍盐质粒纯化系统的发明者。Takegene[®]无胍盐质粒纯化系统有如下优良特性:

- 高纯度的纯化质粒。既没有胍盐残留,也没有离子交换树脂脱落物的残留,提高了测序、连接、转化和酶反应效率。
- 操作方便,费时少。

存储和稳定性

- RNase A 和添加过 RNaseA 的溶液 PA 置于 2~8℃ 长期保存。其余试剂室温避光保存。
保质期: 12 个月。

使用前说明

- 室内温度过低时观察溶液 PB 是否有沉淀。如溶液 PB 出现沉淀, 40℃ ~50℃ 水浴 10 min, 溶液澄清后摇匀使用。
- 首次使用前, 从溶液 PA 瓶中取 1ml 液体加入 RNase A 管中, 轻摇使酶粉全部溶解, 短暂离心将管内壁和管盖内的液滴收集到管底后, 将液体全部移回原 PA 瓶中, 混匀后标记备用(添加过 RNaseA 的溶液 PA 需 2~8℃ 保存)。
- 产品一次最多可提取 50 μg 质粒。高拷贝质粒推荐菌液用量为 1~4 ml。低拷贝质粒需加大菌液用量。
- **细菌过多或过少时, 需根据收集细菌体积调整溶液 PA、PB、PC 和无水乙醇用量:** 先估算离心后的细菌沉淀体积, PA 用量为沉淀体积的 10~15 倍, 溶液 PA、PB、PC 和无水乙醇用量比为 1: 1: 1: 0.5。
- 离心均室温进行, 低温不利于去除 RNA。
- 用户自备试剂耗材: 80%乙醇 (v/v), 无水乙醇、合适规格的离心管。
盒中的 1.5 ml 离心管专用于收集最后一步的质粒溶液。

提取步骤

1. 取大肠杆菌过夜培养液(高拷贝质粒)1~4ml 于离心管中, 12000×g 离心 1min。弃去上清液。向沉淀中加入 200μl 溶液 PA, 充分混悬菌体。

2. 加入 200 μ l 溶液 PB，上下颠倒充分混匀液体，室温放置 2~3min。
注：混匀时不可涡旋剧烈震荡，以免基因组 DNA 污染。放置时间越短超螺旋 DNA 比例越高。当液体澄清粘稠时表明细胞已充分裂解，可进行下一步。放置时间勿超过 5min，当放置 5min 后液体仍未澄清表明菌体过多裂解不彻底。
3. 加入 200 μ l 溶液 PC，颠倒混匀。加 100 μ l 无水乙醇，颠倒混匀。12000 \times g 离心 5min。
4. 将上清液全部移入套有收集管的 mini 离心柱中(小心操作，勿吸入絮状物)。12000 \times g 离心 1min。取出离心柱后弃去收集管中废液，将离心柱放回收集管中。
5. 向离心柱中加入 80%乙醇 650 μ l，12000 \times g 离心 15sec。弃去收集管中废液，将离心柱放回。
6. 最高转速 (\geq 12000 \times g) 离心 2min。
7. 将离心柱取出后放入新的 1.5ml 离心管中。向柱中加入 60~100 μ l 溶液 TE，室温放置 2~3min。12000 \times g 离心 1min。质粒 DNA 溶液即被收集在离心管中。

注 1)：为提高得率，可向柱中央再加入 60~100 μ l 溶液 TE，室温放置后离心收集、合并 DNA 溶液。注意这会增大溶液体积并降低 DNA 浓度。也可将离心收集的 DNA 溶液重新加回柱膜中央后室温放置 2min，12000 \times g 离心 1min 收集液体，这可提升 DNA 浓度但在提高得率方面稍逊于前法。

注 2)：可选用纯水（自备）进行洗脱。纯水 pH 值不低于 7，且 DNA 产物应于 -20 $^{\circ}$ C 保存以防降解。

问题	原因	解决办法
得率低	菌体裂解不完全	加入溶液PB前充分混悬细菌。
	大肠杆菌生长过度或不新鲜	1、大肠杆菌培养勿超过12-16小时。 2、将细菌离心沉淀后如不马上纯化保存于-20 $^{\circ}$ C，不要放在4 $^{\circ}$ C过夜。
	低拷贝质粒	增加细菌培养液用量，并根据离心后细菌体积调整各试剂的用量。
无质粒 DNA	抗菌素失效，大肠杆菌丢失质粒	重新培养。
基因组 DNA污染	操作不当	加溶液PB后混匀时不可涡旋剧烈震荡。放置不要超过5分钟。
RNA 污染	忘加RNase A	往溶液PA中加RNase A。
电泳时质粒漂出加样孔	洗脱液中有乙醇残留。	步骤“6”不可省略。

宁波市重鼎生物技术有限公司

主页：<http://www.genepure.com>

电话：4008780133