

Plasmid DNA Extraction Mini Kit

质粒 DNA 小提中量试剂盒

本产品适合于从 5~15ml 细菌培养液中提取高达 80 μ g 的质粒 DNA。实验流程可在 30 分钟内完成，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。本试剂盒采用碱裂解法进行裂解，通过 DNA 柱于高盐条件下特异性结合 DNA 的特点，达到纯化的目的。纯化的质粒可直接用于酶切、PCR、测序、连接、转化和标记等。

产品组份

产品编号	DP102-01 (20 T)	DP102-02 (100 T)	DP102-03 (250 T)
RNase Solution	60 μ l	300 μ l	750 μ l
Buffer S1	12 ml	60 ml	150 ml
Buffer S2	12 ml	60 ml	150 ml
Buffer S3	18 ml	90 ml	200 ml
Buffer W1P	15 ml	75 ml	180 ml
Buffer W2P	6 ml	30 ml	2 x 40 ml
Buffer EB	3 ml	20 ml	50 ml
DNA Extraction Mini Column III	20	100	250
2 ml Collection Tube	20	100	250

保存条件

本产品除酶制品外，可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月。低温下，Buffer S2 可能会有沉淀形成，需 37 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于 -20 $^{\circ}$ C，试剂盒使用前，短暂离心 RNase Solution，之后将试剂盒提供的 RNase Solution 全部加入至 Buffer S1 中，并保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

注意事项

- Buffer S1 使用前先将 RNase Solution 进行短暂离心，之后全部加入，保存于 2-8℃。
- Buffer W2P 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- 以下离心步骤均在室温进行（20-25℃）
- Buffer S2 及 Buffer S3 对皮肤有一定腐蚀性，不可直接接触。
- Buffer S2 在低温会有白色沉淀析出，须 37℃ 水浴让沉淀完全溶解后再使用，否则会造成产量波动。

实验步骤

1. 取 5~15ml 过夜培养的培养液至离心管中，13,000 × g 离心 1 分钟，收集菌体。
若菌液量多，可通过多次离心弃培养液富集菌体。
2. 倒弃培养基，尽量吸尽残液。加入 500μl Buffer S1（确保已经加入 RNase Solution），高速涡旋重悬沉淀直至看不到细菌团块。
3. 往重悬液中加入 500μl Buffer S2，颠倒混匀 8~10 次。
该步骤不可采用涡旋代替颠倒，否则导致基因组 DNA 被打断，提取的质粒中带有基因组 DNA 片段。充分裂解后溶液颠倒应明显有粘稠感觉且表现透亮。
4. 加入 700μl Buffer S3，立即颠倒 10~15 次让溶液彻底中和使白色沉淀充分分散。
5. 13,000 x g 离心 10 分钟。
6. 将 DNA Extraction Mini Column III 装在收集管中。用移液枪把 750μl 上清液转移至柱子中。13,000 × g 离心 60 秒。
转移过程中尽量避免吸入沉淀造成杂质的引入。
7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，重复第 6 步直至所有上清过柱。
8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 600μl Buffer W1P 至柱子中。13,000 × g 离心 10 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 600μl Buffer W2P（确保无水乙醇已加入）。13,000 × g 离心 10 秒。

10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 600 μ l Buffer W2P (确保无水乙醇已加入)。13,000 \times g 离心 10 秒。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟干燥柱子。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 100 μ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

12. 把柱子套在干净的 1.5ml 离心管中。加入 70-200 μ l Buffer EB 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

13. (可选) 将离心得到的洗脱液重新加入至柱子膜中央，静置 1 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

洗脱体积较小时，可增加该步骤提高回收效率。

14. 弃去柱子，把质粒保存于 -20 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. RNA 污染

- 菌种 RNA 含量较高，加入 Buffer S1 后室温放置 5 分钟充分消化 RNA
- Buffer S1/RNase Solution 放置 2-8℃ 保存勿超半年。

2. DNA 产量低

- 菌种问题：菌种保存过程中容易出现质粒丢失现象，建议养菌前进行平板活化。
- 菌体应该在 Buffer S1 中充分重悬。
- Buffer W2P 没有加入乙醇稀释。
- 加入 Buffer S3 后应立即颠倒混匀。
- 加入 Buffer S2 裂解后溶液浑浊：菌液量加入较多，减少菌液用量。
- 菌液为低拷贝菌液：可提高菌液用量至 30ml，等比例增加 Buffer S1/S2/S3 的用量进行提取，并且进行 2 次洗脱，洗脱液进行 70℃ 预热，其余提取步骤一致。