

质粒DNA 小提中量试剂盒

一、产品简介

采用SDS碱裂解法, 结合硅胶膜选择性吸附DNA的方法, 适合从4-16 ml细菌培养物中提取多至20 µg质粒DNA。纯化的质粒DNA适合用于酶切、PCR、测序、转化和转染肿瘤细胞。

本试剂盒改进了裂解条件(Buffer P2), 避免菌量极少时或者菌液过度老化时可能出现的单链质粒DNA; 优化了中和环境 (Buffer P3), 彻底去除游离SDS, 避免因SDS残留导致的酶切不完全或弥散、转染效率低等情况。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK301-01 (50次)	原理与用途
RNase A1*	120 µl	降解RNA
Buffer P1	30 ml	悬浮细菌
Buffer P2	30 ml	含SDS/NaOH, 裂解细菌
Buffer P3	40 ml	中和, 去除SDS-蛋白-基因组DNA复合物
Buffer WA	15 ml×2	漂洗去除抑制物
Buffer WB [§]	16 ml	漂洗去盐
DNA吸附柱-BM	50个	吸附DNA
收集管	50个×2	接收废液
1.5 ml离心管	50个	接收洗脱的DNA
TE*	15 ml	洗脱DNA
说明书	1份	

*RNase A1: 50 mg/ml, -20℃长期保存; 第一次使用前将RNase A1全部加入Buffer P1中, 于4℃保存。

[§]Buffer WB, 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0(25℃)。

除RNase A1和Buffer P1(已加入RNase A1)外, 其他组成成分于室温储存。

三、注意事项

1. Buffer P2、Buffer P3和Buffer WA含刺激性化合物, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛, 立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处, 必要时寻求医疗咨询。
2. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶盖, 以免影响下次使用效果。

四、实验准备

1. 第一次使用前, 将试剂盒携带的RNase A1全部加入Buffer P1中。
2. 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在Buffer WB中加入无水乙醇, 混合均匀。
3. 每次使用前, 检查Buffer P2是否析出白色或者晶体状沉淀, 如有沉淀在37℃放置数分钟, 沉淀溶解后恢复至室温(约20 min)后使用。

五、操作步骤

所有离心参数为使用台式快速离心机，室温12,000×g；如离心机转速只能设定为rpm，设定为低于最高转速1,000 rpm；

1. 离心收集细菌：菌液置于2 ml离心管中，离心30秒，倒弃上清，反复离心收集4-16 ml细菌培养物中的细菌；弃尽上清。

或将菌液置于10-50 ml离心管，3000×g离心5 min，尽可能去除上清；在步骤2悬浮细菌后转入2 ml离心管。

2. 加入500 µl Buffer P1（请确认已加入RNase A1），Vortex震荡或用枪头吹打充分悬浮细菌，直至无可见的菌块。

3. 加入500 µl Buffer P2（含SDS和NaOH），缓慢翻转离心管10次，直至溶液呈浅黄色透亮状或呈均一的浑浊液。

4. 加入700 µl Buffer P3（含盐酸胍和乙酸），缓慢翻转离心管10次，再剧烈摇晃10次；离心5 min。

缓慢摇晃10次即可充分中和，此时基因组DNA被包裹进入凝集物，质粒DNA恢复超螺旋结构，后续剧烈摇晃不会打断DNA。

剧烈摇晃有利于分散凝集物，方便离心去除。如离心后溶液中有大量悬浮物，应剧烈摇晃后再次离心。

5. 将步骤4中的溶液转入DNA吸附柱-BM（置于收集管），离心1 min，将DNA吸附柱-BM转入另一个干净的收集管。

6. 可选步骤：加入500 µl Buffer WA，离心1 min，弃废液，将DNA吸附柱-B放回收集管。

Buffer WA能有效去除可能残留的SDS和蛋白；核酸酶含量丰富的菌株(如JM系列和HB101)建议操作此步骤。

7. 加入500 µl Buffer WB，离心1 min，弃废液，将DNA吸附柱-B放回收集管。

8. 重复步骤7。

9. 离心2 min。

10. 将DNA吸附柱-BM转入试剂盒携带的1.5 ml离心管，加50-200 µl TE或去离子水(pH≥7.0)，放置1-2min或更长时间，离心1 min。

56-70℃预热TE或去离子水(pH≥7.0)，可以提高洗脱效率。

如果使用去离子水洗脱，需用NaOH将去离子水pH调整至≥7.0。

离心结束后再加入≥50 µl TE或去离子水，重复此步骤，可以提高洗脱效率。

六、常见问题解答

Q1 质粒DNA产量低或无质粒

A1.1 抗生素失效：含有质粒的细菌在抗生素失效时，处于生长劣势，最终全部质粒丢失。可能是抗生素本身失效，也可能培养时间过长抗生素分解。

A1.2 真菌污染：如有真菌污染，加入Buffer P2摇晃后菌体不能被裂解，溶液浑浊不粘稠；加入Buffer P3后很快形成粉末状白色凝集物。

A1.3 细菌老化、死亡：细菌培养通气状况不理想或培养基碳氮比不合适，细菌生长到一定程度后自溶死亡；死亡的细菌不能被充分离心沉淀，或离心沉淀后不能形成明显的沉积界面，用Buffer P1悬浮时溶液比较粘稠。

A1.4 37℃溶解Buffer P2后未恢复到室温：高温、强碱性条件下质粒完全变性为单链，与基因组一起被包裹进入凝集物，在后续步骤中被沉淀去除。

Q2 基因组DNA污染，并且有断裂的质粒DNA

A2.1 细菌过度老化(培养时间过长或者培养后放置时间过长)，部分细菌死亡后自身的核酸酶降解基因组DNA和质粒DNA；

A2.2 操作步骤2未充分悬浮细菌。

Q3 RNA残留

A3.1 RNaseA1失活；

A3.2 菌量偏多，RNA降解的程度不够。建议步骤4摇晃混合后室温放置10-30 min后再离心。

Q4 电泳时有条带迁移速度比超螺旋质粒DNA还快

A4 变性为单链的质粒DNA比超螺旋结构的质粒DNA电泳迁移速度更快。本试剂盒已改进了裂解条件(Buffer P2)，但在菌量极少时或者菌液过度老化的情况下，同时加入Buffer P2后放置时间太长，还是会出现单链质粒DNA。单链质粒DNA不能被限制性内切酶切开，但不影响PCR。

Q5 内切酶无法切开质粒或酶切效率很低

A5.1 抑制物残留，建议操作 6.可选步骤。

A5.2 大量RNA残留(见Q3)。

A5.3 质粒DNA变性为单链(见Q4)。