

高纯度质粒大提试剂盒

(离心柱型)
目录号: GF116

产品内容

产品组成	GF116-01 / (10 preps)
溶液 P1 (Buffer P1)	125 ml
溶液 P2 (Buffer P2)	125 ml
溶液 P3 (Buffer P3)	125 ml
5M NaCl	60 ml
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.5ml×2
过滤器 CS2 (Filtration CS2)	10 个

储存条件

该试剂盒置于室温(15-25℃)干燥条件下,可保存12个月,更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下,若溶液产生沉淀,使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间,必要时可在37℃水浴中预热10min,以溶解沉淀。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中,混匀后置于2-8℃保存,可稳定保存12个月。单独包装的RNase A 在室温可稳定保存12个月以上。

产品简介

本试剂盒采用独特的缓冲系统,结合传统的异丙醇沉淀方法,可快速地获得大量高纯度的质粒DNA。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、转化和转染多种细胞等实验。

推荐每次菌液使用量: 高拷贝质粒推荐使用量为100ml,得率一般在500-1500ug左右;低拷贝质粒推荐使用量为200ml,得率一般在200-400ug左右。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液 P1 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。
2. 使用前先检查溶液 P2 和 P3 是否出现结晶或者沉淀,如有结晶或者沉淀现象,可在 37℃ 水浴中加热几分钟,即可恢复澄清。
3. 注意不要直接接触溶液 P2 和 P3,使用后应立即盖紧盖子。
4. 使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出,避免滤膜因压力而松动。
5. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。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,同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量;洗脱缓冲液推荐在 65-70℃ 水浴中预热。

操作步骤

1. 取100ml (**根据培养菌体的浓度选择合适的量,低拷贝推荐用200ml**) 过夜培养的菌液,室温10,000rpm (~11,500×g) 离心3min收集细菌。

注意: 菌液较多时,可多次离心并将菌体沉淀收集到一个离心管中。

2. 尽量吸除上清,为确保上清液全部吸取,请倒置干净的吸水纸上。

3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入10ml溶液P1(请先检查是否已加入RNase A)，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。
注意：请务必彻底混悬，如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。
4. 向离心管中加入10ml溶液P2，立即温和地上下翻转6-8次，使菌体充分裂解，室温放置4min。
注意：温和地混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA；所用时间不应超过5min，以免质粒受到破坏；此时菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
5. 向离心管中加入10ml溶液P3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置10min左右。10,000rpm($\sim 11,500\times g$)离心10min，使白色沉淀离至管底(可适当增加离心时间)，将全部溶液小心倒入过滤器CS2中(请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器)，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的50ml的管中(客户自备)。
注意：加入溶液P3后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤器CS2中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多(>100ml)，推荐延长离心时间至20-30min。
6. 向滤液中加入0.35倍滤液体积的异丙醇和0.5倍异丙醇体积的5M NaCl，上下颠倒充分混匀。
注意：若此处无沉淀出现为正常现象。
7. 4℃ 10,000rpm($\sim 11,500\times g$)离心30min，轻轻倒掉上清液，将其倒置在吸水纸上。
8. 向管中加入6ml 70%乙醇充分漂洗沉淀，4℃ 10,000rpm($\sim 11,500\times g$)离心10min，轻轻倒掉上清液，将其倒置在吸水纸上。
9. 重复操作步骤8。
10. 将离心管敞口室温放置10-20min，使乙醇充分挥发后加入1-1.5ml 洗脱缓冲液TB，充分溶解沉淀。
注意：洗脱缓冲液体积不应少于1ml，体积过小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响，若用ddH₂O做洗脱液应保证其pH值在7.5-8.0范围内，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。为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置2min，10,000rpm($\sim 11,500\times g$)离心2min，将质粒溶液收集到离心管中。