

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		50 RXN	250 RXN
RNase A	RM30533	30 µL	150 µL
Buffer S1Q	RM30627	15 mL	75 mL
Buffer S2Q	RM30628	15 mL	75 mL
Buffer S3Q	RM30629	21 mL	105 mL
Buffer W2B	RM30630	16 mL	2 × 48 mL
Buffer EB	RM30539	5 mL	25 mL
Spin Column A	RM30631	50 pk	5 × 50 pk
2 mL Collection tube	RM30632	50 pk	5 × 50 pk

*50 RXN Buffer W2B 使用前加入 64 mL 无水乙醇; 250 RXN Buffer W2B 使用前每瓶各加入 192 mL 无水乙醇。

产品说明

本试剂盒采用改进的 SDS-碱裂解法去裂解细胞, 柱内硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA, 再通过漂洗液将杂质和其他细菌成分去除, 最后低盐、高 pH 值的洗脱液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。本试剂盒适合于从 1-4 mL 细菌培养物中提取多至 20 µg 高纯的质粒 DNA, 可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

保存条件

1. 本试剂盒在室温储存不影响使用效果。
2. RNase A 室温可储存 6 个月, 长期储存于 -20°C。

注意事项

1. Buffer S2Q、Buffer S3Q 含刺激性化合物, 操作时要戴乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。
2. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶, 以避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
3. Buffer S2Q 中含有 SDS, 低温容易析出, 使用前若有沉淀, 请置于 37°C 水浴中加热溶解至溶液变澄清方可使用。

操作说明

实验前准备

1. 首次使用时请按说明向 Buffer W2B 中加入规定量的无水乙醇 (用户自备), 充分混匀备用。加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入。
2. 首次使用时, 将试剂盒所带的全部 RNase A (50 mg/mL) 加入 Buffer S1Q 后 (终浓度 100 µg/mL) 置于 4°C 保存。如果 Buffer S1Q 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在 Buffer S1Q 中补加 RNase A 即可 (ABclonal, RM29870)。

实验步骤

1. 取 1-4 mL 在 LB 培养基中培养过夜的菌液, 12,000 rpm 离心 1 min, 尽可能的弃尽上清, 收集菌体。
2. 加 250 µL **Buffer S1Q** (请先检查是否已加入 **RNase A**!) 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至彻底悬浮, 混匀后的溶液为浑浊的红色。
*未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。如果没有涡旋器, 可以用手指轻弹管底, 把沉淀弹开。
3. 加 250 µL **Buffer S2Q**, 温和并充分地上下翻转 8-10 次混匀均匀使菌体充分裂解, 直至形成透亮的紫红色溶液。此步骤不宜超过 5 min。
*Buffer S2Q 使用后立即盖紧瓶盖, 以免空气中的 CO₂ 中和 Buffer S2Q 中的 NaOH, 降低裂解效率。
*避免剧烈摇晃, 否则将导致基因组 DNA 的污染。

4. 加 350 μ L **Buffer S3Q**, 立即温和并充分地上下翻转混合 12-20 次, 充分混匀, 出现白色絮状沉淀, 直至溶液全部变成黄色。12,000 rpm 离心 3 min。

*中和完成后, 絮状沉淀中混有紫红色说明复性不充分, 应继续混匀直至絮状沉淀全部为白色, 溶液全部变为澄清的黄色。

*避免剧烈摇晃, 否则将导致基因组 DNA 的污染。

5. 吸取步骤 4 中的上清液转移到吸附柱 Spin Column A 中 (吸附柱置于收集管 2 mL Collection tube 中), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

*上清液体积 > 800 μ L, 可以分多次过柱。

6. 将吸附柱 Spin Column A 放回收集管 2 mL Collection tube 中, 加 700 μ L **Buffer W2B** (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃滤液; 以同样的方法再用 700 μ L **Buffer W2B** 洗涤一次, 弃滤液。

7. 将吸附柱 Spin Column A 放回收集管 2 mL Collection tube 中, 12,000 rpm 离心 1 min。

8. 取出吸附柱 Spin Column A, 放入新的离心管 (自备) 中, 在吸附柱膜中央加 60-80 μ L Buffer EB 或去离子水, 室温静置 1 min。12,000 rpm 离心 1 min。

*为提高洗脱效率, Buffer EB 或去离子水可预先在 65-70°C 水浴中加热。

*如果需要较大质粒 DNA 浓度, 可以适当减少洗脱液的体积, 2 次重复洗脱。

9. 将所得 DNA 洗脱液置于 -20°C 保存或直接用于后续实验。