杭州新景生物试剂开发有限公司
地址：浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5F
邮编：310030 电话：0571-56011203 传真：0571-87983751

一步法质粒 DNA 小量试剂盒说明书

产品组成

一步法质粒 DNA 小量试剂盒 Cat.No.	50 次制备 1002050	250 次制备 1002250
核酸纯化柱	50 个	250 个
2 ml 收集管	50 个	250 个
裂解酶	180 mg	300 mg×3
裂解酶溶解液	900 μl	1.5 ml×3
Buffer FL	36 ml	60 ml×3
Buffer FW2	36 ml	180 ml
Buffer E	6 ml	30 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存

1. 裂解酶及裂解酶溶解液可室温运输，收到产品后请置于 2-8℃贮存，其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。
2. 裂解酶溶解后，无论是否加入 Buffer FL 中都需置于 2~8℃保存，可稳定保存 4 个月。加入裂解酶后的 Buffer FL 也请置于 2~8℃保存，在 4 个月内使用不影响裂解效果。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本试剂盒采用新型的一步法酶裂解技术，仅需 6 分钟即可从 1-5 ml 过夜培养菌液中快速纯化出高质量的质粒 DNA。独特的缓冲液配方将 SDS 碱裂解法中的菌体重悬、裂解及中和三个步骤合并为一步，搭配先进的硅胶膜吸附技术，能高效特异地结合质粒 DNA，并有效去除蛋白质、基因组 DNA 等杂质。洗脱获得的高质量质粒 DNA，可直接用于酶切、PCR、测序、转化等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管
2. 移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 旋涡振荡器
6. 可能需要水浴锅

使用前准备

使用前将裂解酶溶解液加入裂解酶中，上下颠倒溶解，然后全部转移到 Buffer FL 中，并在标签的方框中打勾做好“裂解酶已加”的标记，混匀后将溶液置于 2~8℃保存。加入裂解酶后的 Buffer FL 在 2~8℃储存 4 个月后其裂解菌体的性能可能会降低，需要重新补加裂解酶后才能正常使用。

注意事项

1. 本试剂盒适用于 end A-宿主菌，end A+宿主菌因存在内源核酸酶，酶切时会导致纯化的质粒降解，推荐使用质粒 DNA 小量试剂盒（Simgen Cat. No. 1001050）提取质粒。
2. 若所提取的质粒为低拷贝质粒或大于 15 kb 的质粒，推荐使用快速质粒 DNA 小量试剂盒(Simgen Cat. No. 1005050)，以获得更好提取效果。
3. 本试剂盒适用于新鲜培养收集的细菌，收集后冷冻保存过的细菌会因为冷冻导致的菌体破裂而影响提取效果，推荐使用快速质粒 DNA 小量试剂盒（Simgen Cat. No. 1005050）。

操作步骤

1. **实验操作前请将 Buffer FL（请先检查是否已加入裂解酶）置于冰上，预冷至 0~4°C后使用。**

* 注意：确保Buffer FL低温使用，否则会影响后续裂解效果，导致产量和纯度偏低。

2. **取 1-5 ml 过夜培养的菌液，加入 2 ml 离心管（自备）中，12000 rpm 离心 1 分钟，弃尽培养基（菌液较多时可通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。**

* 不要使用 1.5 ml 离心管收集菌体，沉积在 1.5 ml 离心管底部的菌体在后续加入 Buffer FL 旋涡振荡的过程中会难以悬浮，导致产生大量难以分散的小菌块。

3. **加入 600 µl 已预冷的 Buffer FL，立即旋涡振荡 30 秒，彻底重悬菌体沉淀，室温（15~25°C）孵育 3 分钟。Buffer FL 使用完后请及时置回 2~8°C保存。**

* 加入 Buffer FL 后，应立即旋涡振荡重悬菌体沉淀直至看不到细菌团块，从而提高产量并避免基因组 DNA 污染。若不立即悬浮菌体（其效果等同于加入未预冷的 Buffer FL），会导致菌体沉淀块表面先被溶解，进而影响菌体沉淀的充分悬浮，产生大量难以分散的小菌块。

* 如果环境温度低于 15℃，应将孵育条件改为在 37℃水浴锅中孵育 3 分钟，否则可能会由于低温导致酶活力降低的原因，使最终质粒 DNA 的回收量降低并残留有 RNA。

* 孵育后菌体悬液应呈半透明状，若溶液呈略微浑浊且不粘稠状态属正常现象，不影响后续实验。

4. **将步骤 3 的溶液全部转移至核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中）中，12000 rpm 离心 30 秒，弃滤液。**
5. **将核酸纯化柱置回 2 ml 收集管中，沿核酸纯化柱管壁四周加入 600 µl Buffer FW2，12000 rpm 离心 30 秒，弃滤液。**
6. **将核酸纯化柱置回 2 ml 收集管中，最高速（≥12000 rpm）离心 1 分钟。**

* 此步骤高速空离是为了去尽残留的液体，请勿省略，否则可能因所纯化的质粒中残留有抑制物而影响后续的实验效果。

7. **弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于洁净的 1.5 ml 离心管（自备）中，向核酸纯化柱膜中央加入 50~100 µl Buffer E，12000 rpm 离心 30 秒。**
8. **弃纯化柱，洗脱的质粒 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将质粒 DNA 储存于－20°C备用。**