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：0571-87381295　传真：0571-87381297

无内毒素质粒 DNA 小提中量试剂盒说明书

产品组成

无内毒素质粒 DNA 小提中量试剂盒 Cat. No.	4 次样品 1006004	50 次制备 1006050
核酸纯化柱	4 个	50 个
2 ml 离心管	4 个	50 个
RNase A	*	56 µl
Buffer I	2.1 ml	28 ml
Buffer II	2.1 ml	28 ml
Buffer N3	1.5 ml	16 ml
Buffer ETR	1.5 ml	16 ml
Buffer W1	3 ml	28 ml
Buffer W2（浓缩液）	3 ml	24 ml
Buffer E	1 ml	12 ml
说明书	1 份	1 份

*4 次样品中的 RNase A 已加入到 Buffer I 中。

产品储存

1. RNase A 和 Buffer ETR 可室温运输，收到产品后请将 RNase A 和 Buffer ETR 置于 2-8℃储存。
2. 加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8℃储存。如果 Buffer I 储存时间超过 6 个月，需补加 RNase A 至终浓度为 100µg/ml。
3. 其他试剂与物品如果储存于室温（15~25℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上（2~8℃储存的产品使用前应先使产品恢复到室温后再使用）。

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

本试剂盒采用了碱裂解法抽提质粒及柱纯化核酸的原理开发而成，适合于从 5～15 ml 细菌培养物（LB 培养基）中提取多至 50µg 无内毒素的高纯度的质粒 DNA，特别适用于真核细胞转染、体外转录与翻译等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 不含内毒素，洁净的 1.5ml 离心管、带盖 2ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性手套、纸巾及防护用品
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）
5. 旋涡振荡器

使用前准备

1） 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2） 准备冰浴和 42 ℃水浴。
3） 向装有 RNase A 的冻存管中加入 1ml Buffer I，混匀后再将溶液吸回到装有 Buffer I 的瓶子中，并在标签的方框中打勾作好“RNase A 已加”的标记，置于 2~8℃保存。
4） 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer W2 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。
5） 当室温低于 15℃时，使用 Buffer II 前应先观察试剂是否有白色沉淀产生，如有沉淀则应于 37℃水浴直至沉淀溶解后再使用。

操作步骤

1）12000 rpm 离心 30 秒收集 5~15ml 过夜培养的细菌，弃尽培养基。加入 500μl 已加入 RNase A 的 Buffer I，充分悬浮沉淀的细菌。

* 可用旋涡振荡器振荡或用移液器反复吸注的方法悬浮沉淀的细菌块。充分悬浮的细菌呈均一的悬浊液，不应留有可见的小菌块，否则将严重影响最后质粒的产量。

2）加入 500μl Buffer II，温和并充分地翻转离心管 4~6 次。

* 使用 Buffer II 前确认溶液中没有可见沉淀存在；Buffer II 使用完后应盖紧瓶盖，避免与空气长期接触。
* 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
* 当细菌裂解充分时，溶液应呈粘稠的半透明状；如果达不到上述效果，可能为细菌用量过多所至，可增加翻转的次数以达到细菌充分裂解的效果。
* 此步骤不应超过 5 分钟。

3）加入 250μl Buffer N3，温和并充分地翻转离心管直至溶液中残留的蓝色沉淀全部消失，转变为淡黄色沉淀。

4）13000 rpm 离心 10 分钟。

5）将步骤 4）中的上清液转移到一个洁净的 1.5ml 离心管中，加入 250μl Buffer ETR，剧烈混合均匀，冰浴 10 分钟，使溶液呈透明状。

6）将 1.5ml 离心管转移到 42℃水浴 5 分钟，使溶液呈现浑浊状。

7）13000 rpm 离心 3 分钟，内毒素将聚集在离心管底部的淡黄色下相中。

8）吸取步骤 7）中的 1.2ml 上相转移到一个自备的带盖 2ml 离心管中，加入 600μl 无水乙醇，混合均匀。

* 注意宁可少转移部分上清液，也不要带入底部含有内毒素的淡黄色下相。

9）吸取 600μl 步骤 8）中的混合液加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

10）弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，重复步骤 9）两次，使步骤 8）中的混合液全部滤过纯化柱。

11）弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500μl Buffer W1，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

12）弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700μl Buffer W2，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer W2 中已经加入无水乙醇。

13)重复步骤 12）一次。

14）弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。
* 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的质粒中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

15）弃 2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 100~200μl Buffer E 或无内毒素超纯水，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

16）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 ℃备用。