

质粒 DNA 小量纯化试剂盒（硅胶膜柱法）使用说明书

【产品名称】质粒 DNA 小量纯化试剂盒（硅胶膜柱法）

英文名称：Plasmid DNA purification kit（Silica membrane）

【包装规格】100 次/盒

【产品编号】TQ005D1

【产品简介】

本产品采用硅胶膜柱法，适合于从 1~5 mL 新鲜细菌培养液中提取质粒 DNA。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR 和标记等。30 分钟可以完成数个样品的抽提工作，整个过程不会接触酚氯仿等有机物抽提，也不需醇类沉淀。

【储存条件及有效期】

Buffer P1 和 RNA 酶 2~8℃ 保存，其他可室温保存，有效期 1 年

储存过程中若溶液产生沉淀，使用前将其在室温放置一段时间或 37℃ 条件下温育，待充分溶解后摇匀即可使用。

【样本类型】

新鲜菌体培养液。

【试剂盒组成】

序号	产品组成	规格
1	Buffer P1	26 mL
2	RNA 酶	10 mg
3	Buffer P2	26 mL
4	Buffer NP3	36 mL
6	Washing Buffer	27 mL（使用前加 108 mL 无水乙醇）
7	Elution Buffer	10 mL
8	DNA 硅胶膜吸附柱	100 套
9	使用说明书	1 份

【使用方法】

● 初次使用前加入 0.2~0.5 mL Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打 5~10 次让 RNase A 充分溶解，然后把 RNase A 溶解液全部转移至 Buffer P1 瓶中，于 2~8℃ 保存；

● 初次使用前请在 Washing Buffer 中加入 108 mL 无水乙醇，参见瓶身标签或使用说明书。

1. 将含质粒的菌种接种于含合适抗生素的 1~5 mL LB 肉汤培养基中，37℃ 摇床培养 12~16 小时；
2. 吸取 1~5 mL 菌体，12,000×g 离心 2 分钟；
3. 倒弃培养基，在吸水纸轻轻拍打吸尽残液。加入 250 μL Buffer P1（已加入 RNase A），高速涡旋重悬细菌。

注意：使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌很关键，重悬后应看不到细菌团块；

4. 往重悬液中加入 250 μL Buffer P2，颠倒混匀 8~10 次。注意：需轻轻颠倒混匀，溶液变得粘稠且透亮表明细菌已充分裂解。如有必要，室温放置 2~3 分钟，其间颠倒混匀几次。处理多个样品时，这一步操作时间不要超过 4 分钟；
5. 加入 350 μL Buffer NP3，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。加入 Buffer NP3 后应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果，静置 2 分钟；
6. 14,000×g 离心 5 分钟；
7. 将 DNA 硅胶膜吸附柱装在收集管中。小心转移离心得到的上清液至柱子中。12,000×g 离心 60 秒；
8. 弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 650 μL Washing Buffer（已加入无水乙醇）至柱子中静置 30 秒。12,000×g 离心 60 秒；

9. 弃滤液，把柱子套回收集管中。12,000×g 离心 3 分钟清除残余滤液；
 - 将柱子套在灭菌的 1.5 mL 离心管中可开盖静置 5 分钟让残留的乙醇尽可能挥发干净，乙醇残留会降低 OD260/OD230 的比值。
10. 把硅胶膜吸附柱套在灭菌的 1.5mL 离心管中。根据需求加入 30-100μL 预热至 65°C 的 Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。静置 3 分钟，12,000 ×g 离心 1 分钟洗脱 DNA。柱子最低的洗脱体积为 30 μL。低于 30μL 会导致洗脱效率下降。若需要获得最高产量，可用洗脱液重复该步骤进行第二次洗脱；
 - Elution Buffer 可用无菌去离子水替代，但 pH 值应在 8.0~8.5。
 - 将 Elution Buffer 预热到 65°C 使用，可提高质粒 DNA 得率。
 - 为提高质粒 DNA 提取得率，可将洗脱得到的溶液再次吸出滴加到吸附柱中央，静置几分钟后再次离心收集。
11. 弃硅胶膜吸附柱，把抽提得到的质粒保存于 -20°C。

【纯度及浓度检测分析】

1. 提取得到的质粒 DNA 可用紫外分光光度计测量浓度与纯度。
2. DNA 在 OD 260 处有明显的吸收峰，在此条件下，1 OD 值的光密度相当于双链 DNA 浓度为 50 μg/mL；单链 DNA 或 RNA 为 40 μg/mL；寡核苷酸为 20 μg/mL。
3. OD260/280=1.7~1.9，如果 A260/280≤1.7 或比值过低，表示受到蛋白（芳香族）或酚类物质污染，需要纯化样品。若 DNA 样品中 A260/280>2.0 表明样品有 RNA 或 DNA 降解。
4. Elution Buffer 使用去离子水时候，OD260/280 会偏低，但不表示纯度低。

【注意事项】

1. 可先将菌种划线至合适的含抗生素的平板上，待长出单菌落后，挑取长势较好的单菌落接种至含抗生素的 LB 肉汤中培养 12~16 h，这样有利于提高质粒得率。
2. 本试剂盒提取使用的器皿、移液器等均应为专用，离心管、枪头等一次性耗材需进行高压灭菌。操作人员应穿戴洁净工作服、口罩、帽子、使用一次性无粉手套。
3. 尽量使用新鲜菌液提取，可以降低质粒 DNA 丢失的风险。
4. Buffer P2 使用后需尽快盖上瓶盖，减少与空气中的 CO₂ 接触，尽量避免影响提取效果。
5. Washing Buffer 使用后盖紧盖子，以免乙醇挥发影响提取效果。
6. 如果质粒 DNA 需长期保存，建议使用 Elution Buffer 洗脱，分装保存于 -20°C 或 -80°C。
7. 请严格按照本说明书操作步骤进行，不同批号的试剂若无特殊说明，请勿混合使用，并保证在有效期内使用该试剂盒，因操作不当导致的质粒 DNA 提取效果不佳，本公司概不负责。
8. 妥善处理所有样本和试剂材料，彻底清洁和消毒操作台面。

【生产企业】

企业名称：广东环凯生物科技有限公司

生产地址：肇庆高新技术产业开发区科技大街中 13 号

邮政编码：526238

销售热线：0758-3680999 转 8001

技术热线：0758-3680999 转 8018

企业网址：<http://www.bhkbio.com>

【说明书修改时间】2024 年 4 月 18 日