使用前请仔细阅读说明书　　版本号：202201

质粒小提试剂盒
（离心柱型）

货号：DP001　　规格：100T/200T　　保存：室温（RNase A -20℃保存）

产品组成

试剂盒组成	DP001-01（100T）	DP001-02（200T）	保存温度
RNase A	500ul	1000ul	-20℃
溶液I	30ml	60ml	RT
溶液II	30ml	60ml	RT
溶液III	40ml	80ml	RT
漂洗液	15ml×2	30ml×2	RT
洗脱液	30ml	60ml	RT
吸附柱	100 个	200 个	RT
收集管	100 个	200 个	RT
说明书	1 份	1 份	—

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。RNase A -20℃长期保存，2-8℃可稳定保存。若溶液产生沉淀，可在 37℃水浴中预热 10min，以溶解沉淀。溶液I在使用前先加入 RNaseA（将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入），混匀，置于 2-8℃保存。单独包装的 RNase A -20℃稳定保存 12 个月以上。

产品说明：

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，根据离心吸附柱在高盐状态下特异性结合溶液中 DNA 的原理特异性提取质粒 DNA。离心吸附柱中采用的硅基质材料能高效、专一地吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其他有机化合物。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、连接和转化等试验。

使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。如非指明，所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

操作步骤：

1、取 1-5ml 细菌培养物，12000rpm 离心 1min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。

2、向留有菌体沉淀的离心管中加入 250ul 溶液I（请先检查是否已加入 RNase A），使用移液器或旋涡振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意：如果菌块未彻底混匀，会影响裂解导致质粒提

取量和纯度偏低。

3、向离心管中加入 250ul 溶液II，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意：混匀一定要温和，以免打断细菌基因组 DNA 进而造成污染，此时菌液应变得清亮粘稠，作用时间不要超过 5min，以免质粒受到破坏。

4、向离心管中加入 350ul 溶液III，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。12000rpm 离心 10min，用移液器小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，尽量不要吸出沉淀。注意：溶液III加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

5、将上一步所得上清液加入吸附柱中（吸附柱加入收集管中），室温放置 2min，12000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6、向吸附柱中加入 700ul 漂洗液（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

7、向吸附柱中加入 500ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

8、12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温放置数分钟，目的是去除吸附柱中残余的漂洗液，否则漂洗液中的乙醇会影响后续实验，如酶切、PCR 等。

9、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50-200ul 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。

10、为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 1min。提取获得的质粒 DNA 经浓度及纯度检测后于-20℃保存。

注意事项:

1、使用前请先检查溶液II和溶液III是否出现混浊，如有混浊现象，可经 37℃水浴，待溶液恢复澄清后再使用。溶液II、溶液III和漂洗液使用时避免直接接触，后应立即拧紧盖子。

2、洗脱缓冲液体积不应少于 50ul，体积过小影响回收效率；洗脱液的 pH 值对洗脱效率也有影响，若需要用水做洗脱液应保证其 pH 值在 8.0 左右（可用 NaOH 将水的 pH 值调至此范围），pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率，提取产物应保存在-20℃，以防降解。

3、 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，使用 5-10ml 过夜培养物，同时按照比例增加溶液I、溶液II和溶液III的用量，吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率。

4、浓度及纯度检测：得到的质粒 DNA 纯度可用琼脂糖疑胶电泳和紫外分光光度计进行检测，其与样品保存时间、操作过程中的剪切力等因素有关。DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50ug/ml 双链 DNA、40ug/ml 单链 DNA。OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响吸光值，但并不表示纯度低。