

11、加入 3ml 无水乙醇, 10,000rpm 离心 2min。

注: 利于离心柱快速晾干, 可省略。

12、10,000 rpm 再次离心 5min 以甩干剩余液体。

13、将离心管柱置于清洗干净的离心柱套管中, 室温敞开心管盖放置 5 ~ 10min, 向吸附膜中加入 1 ~ 2ml Elution buffer, 室温放置 2min, 12,000rpm 离心 5min, 管底即为质粒 DNA。

注: 为了增加质粒洗脱效率, 可将得到的溶液再次加入离心柱中, 重复步骤 13。

七、纯化效果检测:

1、提取后得到的产物可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度和纯度。

2、DNA 在 260nm 处有吸收峰, OD260 为 1 时大概相当于 50 μ g/ml 双链 DNA, 40 μ g/ml 单链 DNA。

3、核酸浓度 (μ g/ml) = OD260 \times 50 \times 稀释倍数。

4、OD260/OD280 的值应该为 1.7 ~ 2.0。

八、常见问题分析及建议及处理方法

1、RNA 残留。

1) Buffer GM1 没加 RNase A: 将 RNase A 加入溶液 Buffer GM1。

2) Buffer GM1 中 RNase A 失活: Buffer GM1 加入 RNase 后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

2、提取率低。

1) 细菌培养过久: 培养时间最好不要超过 16 h。

2) 质粒拷贝数低: 加大菌的用量, 并根据实际情况按比例加大溶液 GM1、GM2、GM3 的用量。

3) 菌量过少, 浓度过低: 加大菌液用量。

4) 菌体重悬不充分: 加 Buffer GM1 后充分重悬。

5) Buffer WM 中没有加入无水乙醇: 确保溶液 Buffer WM 加入无水乙醇。

6) 洗脱液使用不当: 确保使用试剂盒提供的洗涤液。

7) 洗脱不充分: 确保足够洗脱时间和 Elution 用前 37-65 $^{\circ}$ C 预热。

8) 电泳缓冲液 pH 过高: 确保待测样品电泳时使用新鲜缓冲液。

质粒 DNA 大量提取试剂盒 GV- Plasmid DNAMaxi Extraction Kit

Cat #: GV-MN-M-5/GV-MN-M-10

产品规格: 5T/10T

保存与运输: 收到试剂盒, 请按照标签要求与相应条件保存。

本试剂盒采用改进的 SDS 碱裂解法, 结合 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适合于从 125-250ml 培养过夜的细菌培养物中提取多至 500 μ g 高纯度的质粒 DNA, 用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、储存、稳定性

成分	5T	10T	注意事项
RNase A	500 μ l	1ml	100mg/ml, -20 $^{\circ}$ C
Buffer GM1	50ml	100ml	
Buffer GM2	50ml	100ml	
Buffer GM3	50ml	100ml	
Buffer WM	30ml	30ml \times 2	Add 70ml(5T)/70ml (10T) ethanol
Elution buffer	12ml	24ml	For DNA Elute
Spin Columns	5	10	Max adsorption up to 20 μ g each
casing pipe	5	10	
去蛋白滤膜	5	10	
Handbook	1	1	

RNase A: -20℃保存。

Buffer GM1: 细菌悬浮液。加入 RNase A 后，混匀，4℃贮存。

Buffer GM2: 细菌裂解液（含 SDS/NaOH），室温密闭贮存。

Buffer GM3: 中和液，室温密闭贮存。

Buffer WM: 洗涤液，第一次使用前按照试剂瓶上指定加入无水乙醇，室温密闭贮存。

Elution buffer: 10mM Tris-HCl, pH8.0。室温密闭贮存。

二、自备试剂

无水乙醇，异丙醇

三、注意事项

- 1、DNA 呈酸性，建议在 10mM Tris-HCl, pH8.0 洗脱液中保存。
- 2、BufferGM2, Buffer GM3, 含有刺激性化合物，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。
- 3、Elution buffer 可用无菌双蒸水代替（ $\text{pH} \geq 7.5$ ），加入体积视质粒拷贝数多少、用户对质粒浓度要求而定。洗脱体积不要小于 1ml。
- 4、去蛋白滤膜和离心柱套管可洗净后反复使用。

四、产品特点

- 1、快速：1h 左右即可完成提取。
- 2、得率高：高拷贝质粒可提取 400ug ~ 1.2mg（125ml 菌液）。
低拷贝质粒可提取 200ug ~ 500ug（250ml 菌液）。
- 3、纯度好：OD260/280 比值 1.8 以上。
- 4、操作可视化：溶液包含指示剂，指示裂解、中和是否完全，可根据颜色变化调整裂解中和时间，保证质粒提取质量。

五、实验前试剂准备

- 1、第一次使用时将 RNase A 全部加入到 Buffer GM1 中，之后试剂 4℃保存。
- 2、使用前 Buffer WM 中按照试剂瓶上指定量加入无水乙醇。

3、检查 Buffer GM2 是否出现沉淀，若有沉淀，应于 37 ~ 65℃温浴溶解后再使用。

4、将 Elution buffer 或双蒸水 37 ~ 65℃预热，有利于提高洗脱效率。

六、操作步骤

- 1、取 125ml 培养过夜的菌液（根据质粒拷贝数以及菌体浓度来决定适合的菌液量，低拷贝质粒可用 250ml 菌液），8000rpm 离心 10min，尽量除尽上清
注：可用干净的吸水纸吸除瓶壁上的水滴或将离心瓶倒扣在吸水纸上。
- 2、加入 8ml Buffer GM1 悬浮细菌沉淀，悬浮均匀，直至无菌块存在。
注：可使用一次性吸管抽吸搅拌均匀（货号：SR-P-008）。
- 3、加入 8ml Buffer GM2，温和并充分搅拌均匀 3min 使菌体充分裂解，直至溶液变为清亮粘稠的红色，若未变清亮则裂解不完全，继续混匀至溶液完全变为清亮的红色。
注：避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。
此步骤不宜超过 5min。混匀时用力不宜过度，看到溶液变粘变澄清即可。
- 4、加 8ml Buffer GM3，温和并充分搅拌均匀，形成白色絮状沉淀，室温放置 5min。
注：加入 Buffer GM3 后应立即混合，以避免形成局部的沉淀。
避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。
加入 GS3 彻底混匀后，溶液恢复成无色，可见大量白色絮状沉淀。若白色沉淀中夹杂红色则为中和不完全，需要继续混匀至溶液无色。
- 5、10,000rpm 离心 10min。
- 6、将上清转移至烧杯或离心管中，加入 0.3 倍体积的异丙醇，混合均匀。
注：若沉淀未完全沉至管底，可用去蛋白滤膜加以过滤。
- 7、将溶液转移到离心柱中，静置 2min。
注：此步骤中上清一次转不完，可分三次离心。
- 8、10,000rpm 离心 2 min，弃废液。
- 9、加入 8ml Buffer WM（使用前加入无水乙醇），静置 2min，10,000rpm 离心 2min，弃废液。
- 10、重复步骤 9 一次。