

## GF-1 质粒 DNA 提取试剂盒说明书

版本 3.1

## 产品简介:

GF-1 质粒 DNA 提取试剂盒用于从培养的细菌菌液（含有各种质粒）中快速、有效提取高拷贝数和低拷贝数质粒 DNA，不需要进行沉淀或有机提取法。本试剂盒采用一个经特殊处理的玻璃纤维滤膜固定到柱子中，在高盐下有效地结合 DNA。结合碱裂解-SDS法和核酸纯化柱技术，可以从细菌培养物中分离高达 20 µg 质粒 DNA。可以快速处理多个样品，通过实际操作，提取纯化时间不超过 30 分钟。优化的缓冲液能提取高纯度的质粒 DNA，可用于许多常规分子生物学实验，如酶切，放射性/荧光 DNA 测序，PCR，连接，转化和其他操作。

质粒浓度	菌液体积	产量	纯度
高拷贝数质粒 (50-500copies/细胞)	2ml	2-5µg	1.7-1.9
	5ml	10-20µg	1.7-1.9
低拷贝数质粒 (1-10copies/细胞)	2ml	1-3µg	1.7-1.9
	5ml	5-10µg	1.7-1.9

## 试剂盒组成成份

产品目录号	5 次 样品	25 次 CN/GF- PL-025	100 次 CN/GF- PL-100	200 次 CN/GF- PL-200
<b>组份</b>				
GF-1 亲和柱(GF-1 columns)	5	25	100	200
收集管 (Collection tubes)	5	25	100	200
溶液 1 (S1)* Solution 1 (S1)*	1.5ml	8ml	30ml	55ml
溶液 2 (S2)* Solution 2 (S2)*	1.5ml	8ml	30ml	55ml
平衡缓冲液 (缓冲液 NB) Neutralizing Buffer (Buffer NB)	2.5ml	13ml	50ml	90ml
洗涤液 (浓缩液)* Wash Buffer (concentrate)*	2.4ml	9ml	34ml	2 X34 ml
RNase A (无 DNA 酶)*	7.5µl	40µl	150µl	275µl
RNase A (DNase-free)*				
洗脱液 (Elution Buffer)	1.5ml	5ml	20ml	30ml
使用说明 (Handbook)	1	1	1	1

注意：标\*的请参照配制方案以及其储存条件和稳定性。

GF-1 质粒 DNA 提取试剂盒有 25 次、100 次、200 次包装。本试剂盒仅供研究使用。

## 自备材料

无水乙醇 (>95%)

## 配制方案

贴有洗涤液标签的浓缩液，在使用前需用无水乙醇 (>95%) 稀释。

将 RNA 酶 A (无 DNA 酶) 加入至贴有 S1 标签的瓶子中。

## 样品 (5 次):

在洗涤液中加入 3.5ml 无水乙醇。

在 RNase A 管中加入 1ml S1 并充分混匀。瞬时离心将全部混合液返回至 S1 瓶，充分混匀。

## CN/GF-PL-025 (25 次)

在洗涤液中加入 21ml 无水乙醇。

在 RNase A 管中加入 1ml S1 并充分混匀。瞬时离心将全部混合液返回至 S1 瓶，充分混匀。

## CN/GF-PL-100 (100 次)

在洗涤液中加入 80ml 无水乙醇。

在 RNase A 管中加入 1ml S1 并充分混匀。瞬时离心将全部混合液返回至 S1 瓶，充分混匀。

## CN/GF-PL-200 (200 次)

在洗涤液中加入 80ml 无水乙醇。使用完后再以同方式稀释第二瓶洗涤液。

在 RNase A 管中加入 1ml S1 并充分混匀。瞬时离心将全部混合液返回至 S1 瓶，充分混匀。

洗涤液使用后拧紧瓶盖，室温保存。

S1 瓶中的 RNase A 溶液在 2°C - 8°C 下可稳定保存 6 个月。

## 储存及稳定性

- 加入 RNase A 的溶液 S1 2°C - 8°C 保存。
- 其他溶液 20°C - 30°C 保存。
- 确保 S2 在使用完后立即拧上盖子，避免与空气中的 CO<sub>2</sub> 中和。如果溶液中有沉淀产生，应 37°C 加热。溶液 S2 室温保存。
- 试剂盒各组份自生产之日起可稳定保存 18 个月。缓冲液 NB 在室温过低时易出现结晶，使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

## 化学危害

缓冲液 NB 含有胍盐，当接触皮肤或吞服时可能造成危害。使用时一定要戴上手套并做好安全防护措施。不能将含有漂白剂或任何形式的酸性溶液加入到含有胍盐的提取废料中进行消毒。清洁沾染试剂的物品，不需要用漂白剂和酸性溶液清洗，只需浸泡在洗涤剂和水中即可除去胍盐。

## 操作步骤

## 提示

- 所有操作均在室温下进行，除非另有说明。
- 洗涤液 (浓缩液) 在使用前必须用无水乙醇稀释，S1 中需加入 RNase A。请参照配制方案。
- 如果缓冲液 NB 出现结晶，使用前请置于 55°C-65°C 环境中至晶体完全溶解。

## 1、菌种的制备

在 5-10ml 含有适当的抗生素的 LB 培养基中接种含质粒的细菌，37°C 震荡培养过夜 (12-16 小时)。

注：必须用新鲜的菌液进行提取。

## 2、离心

取 1.5-5ml 含有质粒的细菌菌液，6,000 x g (8,500rpm) 离心 2 分钟。如果使用 15-50ml 离心管，则 6,000 x g (8,500rpm) 离心 5 分钟。倒出全部上清。

注：高速或长时间离心，细胞会变得过于紧密难以重新悬浮。

## 3、重新悬浮沉淀

在沉淀中加入 250  $\mu$ l S1，漩涡振荡或反复吹打使菌体全部重新悬浮。将悬浮液体转移至一干净的 1.5ml 微量离心管中。

**注：确保菌体完全悬浮。不完全悬浮易导致菌体裂解不完全。确保 S1 在使用前已加入 RNase A（参照配制方案）。**

#### 4、碱裂解

加入 250  $\mu$ l S2，轻轻地颠倒混匀数次（4-6 次），获得一份清澈的裂解产物。冰上或室温温育不超过 5 分钟。

**注：请勿漩涡振荡，漩涡振荡会使基因组 DNA 破碎，导致染色体 DNA 污染。**

**S2 使用后应立即拧上盖子。**

**某些细菌菌株，通过冰上温育会降低非超螺旋质粒污染。**

**低温环境下，SDS 和细胞碎片在下面中和反应中，更加有效沉淀。**

#### 5、中和反应

加入 400  $\mu$ l 缓冲液 NB，轻轻颠倒混匀数次（6-10 次），直到出现白色沉淀，14,000 -16,000 x g (14000~16000rpm) 离心 10 分钟。

**注：加入缓冲液 NB 后不能漩涡振荡！漩涡振荡会使染色体 DNA 破碎，导致染色体 DNA 污染。**

经离心分离后，紧密结合的白色沉淀应该被离心下来并和上层液体分离。

#### 6、装载到亲和柱

将 650  $\mu$ l 上清转移至一带有干净收集管的亲和柱中，10,000 x g (11,000rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。重复步骤 5 的剩余样本。

**注：不要将白色沉淀转移到柱子中。**

#### 7、柱子洗涤

加入 650  $\mu$ l 洗涤液洗涤柱子，10,000 x g (11,000rpm) 离心 1 分钟，丢弃废液。

**注：使用前确保洗涤液已用无水乙醇稀释（参照配制方案）。**

#### 8、柱子干燥

10,000 x g (11,000rpm) 离心柱子 1 分钟，除去残留乙醇。

**注：这个步骤是为了完全除去所有残留乙醇，因为残留乙醇会影响 DNA 质量，还可能抑制后续的酶反应。**

#### 9、DNA 洗脱

将柱子放入一干净的微量离心管，取 50-100  $\mu$ l 洗脱液，TE 缓冲液或无菌水直接加入到柱子的膜中央，室温静置 1 分钟。10,000 x g (11,000rpm) 离心 1 分钟以洗脱 DNA。DNA 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

**注：确保洗脱液被直接加入到膜中央以完全洗脱 DNA。TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制酶反应，但仍可洗脱 DNA。如果用水洗脱 DNA，pH 值为 7.0-8.5 时洗脱效果最好。当缺乏缓冲剂时，DNA 可能降解，此时 DNA -20 $^{\circ}$ C 保存。**

#### 故障排除

不按照给定的说明进行操作将会出现不符合标准的结果，将影响 DNA 的得率和质量，如果出现此类问题，请参照以下内容处理：

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	菌体裂解不完全或加入 S2 之后裂解产物不清澈	菌体体积不要超过 5ml 推荐体积。 按照以下配方配制新的 S2：0.2N NaOH, 1% SDS。
	菌体悬浮效果不好	确保在加入 S1 后细胞完全悬浮，无菌体沉淀可见。

问题	可能的原因	建议
DNA 得率低	质粒拷贝数低	增加培养物体积或在肉汤培养基中培养来提高得率。
	菌体培养时间过长或不新鲜	菌体在 37 $^{\circ}$ C 下培养不要超过 20 小时，可能会降低质粒产量。 培养基应该含有适当浓度的抗生素。
	没有正确洗脱	确保洗脱液为低盐缓冲液或 pH 7.0-8.5 的水。
柱子堵塞	白色沉淀物被转移到柱子中	为防止堵塞柱子膜，确保在转移过程中没有白色沉淀物转移到柱子中。
高分子量 DNA 污染	剧烈混合加入了 S2 或缓冲液 NB 的裂解产物	加入 S2 或缓冲液 NB 后不要漩涡振荡或剧烈混合。只需轻轻颠倒混匀几次。
	加入 S2 后温育时间超过 5 分钟	温育时间不要超过 5 分钟。
其他质粒形成	菌体裂解期间的不可逆性变性	加入 S2 后静置时间不要超过 5 分钟。
	因核酸酶造成的缺口的环状质粒	纯化步骤不可怠慢，至少至洗涤步骤为止以去除核酸酶。 加入 S2 后冰上静置以降低核酸酶活性。
RNA 污染	RNA 酶消化不充分	确保 RNase A 已加入到 S1 中或在 S1 中加入新配置的 RNase A，使其终浓度为 100ug/ml。
洗脱的 DNA 在下游应用中性能差	洗脱下来的 DNA 含有残留乙醇	确保在洗脱之前柱子已进行干燥。
	用 TE 缓冲液洗脱 DNA，TE 缓冲液中的 EDTA 可能抑制酶反应	用洗脱液或 pH 为 7.0-8.5 的水洗脱 DNA。

#### 上海凯斯泰尔生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区康新公路 3377 号 2 号楼 604 室

电话：021-68060114

传真：021-68060114

邮箱：info@kestrel-china.com

网址：www.kestrel-china.com

#### Vivantis Technologies Sdn Bhd

1012 S.Coast Highway Suite 1,Oceanside CA 92054, USA.

Tel: +6 03 8025 1603

Fax: +6 03 8025 1637

Email: info@vivanttechnologies.com

international@vivanttechnologies.com

Web: www.vivanttechnologies.com