

SteadyPure 质粒DNA中量提取试剂盒

SteadyPure Plasmid DNA Extraction Midi Kit

Code No. AG21032

包装量: 50 rxns
保存温度: Package 2-1 -20°C
 Package 2-2 室温 (15-30°C)

产品概述

本产品可从5 ml-15 ml (< 40 OD) 培养过夜的菌液中提取获得多至70 μg的质粒DNA。本产品采用优化的SDS-碱裂解法裂解细胞, 可有效去除基因组DNA、RNA及蛋白质等杂质, 同时使用高效的离心吸附柱, 可获得高收量、高纯度的质粒 DNA。纯化获得的质粒DNA可直接用于后续转化、DNA 序列分析、体外转录、限制酶切等分子生物学实验。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂, 实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套, 然后再进行实验操作。

【注意: 实验过程中产生的废液需要收集在废液桶中专门处理。】

如果 Buffer LS、Buffer BS 或 Buffer WA 不小心溅到皮肤表面, 请立刻用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成^{*1}

RNase A (10 mg/ml)	280 μl
Buffer RS ^{*2}	28 ml
Buffer LS	25 ml
Buffer BS	35 ml
Buffer WA	25 ml
Buffer WB ^{*3}	27 ml
Elution Buffer	10 ml
<i>Plasmid DNA</i> Midi Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs

*1: 组分中 RNase A 包装于 Package 2-1 中, 需放置于 -20°C 保存; 其余组分均包装于 Package 2-2 中, 室温 (15 ~ 30°C) 保存。

*2: Buffer RS 首次使用前, 需要将 RNase A 混入 Buffer RS 中 (RNase A 与 Buffer RS 体积比为 1 : 100), 均匀混合后在瓶子上做好标记。加入了 RNase A 后的 Buffer RS 需保存在 2 ~ 8°C, 可保存 6 个月。

*3: Buffer WB 在首次使用前, 请添加 63 ml 的无水乙醇 (Buffer WB 与无水乙醇体积比为 3 : 7), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。

保存及运输

保存温度: Package 2-1 -20°C 保存

Package 2-2 室温 (15-30°C) 保存

运输温度: Package 2-1 干冰或 -20°C 冰袋运输

Package 2-2 室温运输

实验前准备

1. 无水乙醇、灭菌水、1.5 ml 离心管、水浴锅。
2. 若 Buffer LS 出现沉淀, 请于 37°C 溶解后使用。
3. 操作前请将 Buffer BS 放置于冰上或 4°C 冰箱进行预冷。
4. 洗脱结合于 *Plasmid DNA* Midi Columns 上的质粒 DNA 时, 将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 50 ~ 65°C 使用, 将会提高质粒 DNA 的洗脱效率。

➤ 注意事项

1. 加入 Buffer LS 和 Buffer BS 后，不能剧烈混合，剧烈混合会导致菌体基因组 DNA 的释放，从而污染质粒 DNA。
2. 加入 Buffer BS 后，应轻柔并充分混合使蛋白质、基因组 DNA 等形成白色团状物，离心后沉降于离心管底部。若混匀不充分可能会导致不能形成白色团状物，不利于离心沉淀，此时应加大混匀力度及次数，使其形成白色团状物，再离心沉降于离心管底部。
3. 纯化的质粒 DNA 用于 DNA 序列分析时，建议使用灭菌水洗脱质粒 DNA。若需长期保存，建议使用 Elution Buffer 洗脱质粒 DNA。

➤ 操作流程

1. 菌体准备。取 5 ~ 15 ml 过夜培养的菌液，菌液总 OD 约为 10 ~ 40【OD 值大于 40 时，建议在下述 2 ~ 4 步骤中按比例增加试剂的用量】，12,000 rpm 室温离心 2 min，弃上清。

【注：菌液超过 2 ml 时，需要将菌液分多次收集于一个 2 ml 离心管中，加入 2 ml 菌液、离心、弃上清，然后再次加入菌液，重复此步骤；或使用更大容积的离心管。】



离心、去上清

2. 向离心管中加入 500 μ l 的 Buffer RS (含 RNase A)，使用涡旋振荡或移液器反复吹打等方式，充分悬浮菌体沉淀，直至悬浮液中没有菌块残留。

【注：① 请确定 Buffer RS 中已加入 RNase A (RNase A 与 Buffer RS 体积比为 1 : 100)。

② 若采用大于 2ml 容积的离心管进行菌体收集，可在菌体重悬后转移菌体重悬液至 2ml 离心管中进行后续操作。】



500 μ l Buffer RS
500 μ l Buffer LS
700 μ l Buffer BS
离心 10 min
取上清

3. 向上述悬浮液中加入 500 μ l 的 Buffer LS，轻柔上下颠倒混匀 6 ~ 8 次，至溶液变透明，此时溶液比较粘稠。

【注：溶液混匀需轻柔，切勿剧烈混合，剧烈混合会导致菌体基因组 DNA 的释放，从而污染质粒 DNA。】

4. 向上述裂解液中加入 700 μ l 预冷的 Buffer BS，此时溶液中会出现白色团状物。轻柔上下颠倒混匀 6 ~ 8 次。

【注：① 步骤 3、4 总时长不宜超过 5 min。

② 溶液混匀需轻柔，切勿剧烈混合，剧烈混合会导致菌体基因组 DNA 的释放，从而污染质粒 DNA。】

5. 静置 2 min，12,000 rpm 室温离心 10 min，取上清。

6. 将上述上清液全部转移至 *Plasmid DNA* Midi Columns 中，室温静置 1 min 后，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。

【注：*Plasmid DNA* Midi Columns 的最大容积为 750 μ l，转移时如果液体的体积超出最大容积，请分次转移：上样 750 μ l 混合液后，离心，弃滤液，然后将剩余混合液再次上样，离心，弃滤液。】



离心，弃滤液

7. 向 *Plasmid DNA* Midi Columns 中加入 500 μ l 的 Buffer WA，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。

8. 向 *Plasmid DNA* Midi Columns 中加入 750 μ l 的 Buffer WB，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。

【注：请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】

9. 重复步骤 8 一次。

10. 将 *Plasmid DNA* Midi Columns 安置于新的 2.0 ml Collection tubes 上，12,000 rpm 室温离心 2 min。

【注：此步骤需竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰收集管壁；安装于新的 2.0 ml Collection tubes 中有利于提高 DNA 纯度。】



500 μ l Buffer WA 洗一次
750 μ l Buffer WB 洗两次

11. 将 *Plasmid DNA* Midi Columns 安置于新的 1.5 ml 的离心管上，向 *Plasmid DNA* Midi Columns 膜的中央处加入 50 μ l ~ 200 μ l Elution Buffer 或灭菌水，室温放置 1 min。

【注：① 将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 50 ~ 65 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。

② 此步骤需竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰离心管管壁。】

12. 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱获得质粒 DNA。纯化的质粒 DNA 若立即用于后续实验可于 4 $^{\circ}$ C 暂存，长期保存请放置于 -20 $^{\circ}$ C。



50 μ l ~ 200 μ l Elution Buffer
或灭菌水
离心