

## 一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50次 (DP5101)	100次 (DP5102)	200次 (DP5103)
平衡液	室温	25 ml	50 ml	100 ml
RNase A	-20℃	150μl(10mg/ml)	300μl(10mg/ml)	500μl(10mg/ml)
溶液 P1	4℃	15 ml	30 ml	50 ml
溶液 P2	室温	15 ml	30 ml	50 ml
溶液 P3	室温	20 ml	40 ml	80 ml
去蛋白液 PE	室温	27 ml	50 ml	100 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml	25ml	50 ml
		<b>第一次使用前按说明加指定量乙醇</b>		
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml	20ml	20 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个	200 个

..

本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

### 注意事项

- 第一次使用时，将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100ug/ml）置于 4℃ 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留，这时可在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 第一次使用前请先在 15ml 漂洗液 WB 中加入 45ml(50 次制备)无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

## 六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
质粒DNA产量低	培养基中忘加抗生素，非质粒转化细胞过度生长	确保固体，液体培养基中都加入了适当的抗生素。
	酵母培养时间太长，老化菌开始裂解	接种过夜培养板的新鲜单菌落于加了合适抗生素的培养基中培养 12-16 个小时。
	使用了低拷贝数质粒	建议使用高拷贝数质粒，低拷贝数质粒应该适当加大处理体积。
	酵母培养时间过短，菌液内酵母菌浓度过低	酵母菌培养到[A <sub>600</sub> ]吸光值为 2-4 的时候收集菌体。
	酵母菌细胞裂解不完全	使用建议的菌体处理量处理菌体，不要过量；涡旋或者吹打，确保菌体充分重悬于溶液 P1 中，不应该见到未散开的酵母菌团块；加入裂解液 P2 裂解后，应该是粘稠和透明的。
	质粒 DNA 产量使用分光光度计定量不准确	分光光度计定量常常偏高，使用琼脂糖电泳/EB 染色定量。
	洗脱效率不高	<b>请阅读实验步骤 9 和注意事项 6</b>
未提取到质粒DNA	漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇	<b>第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇。</b>
	质粒洗脱液含有较多乙醇，琼脂糖电泳/EB 染色定量时质粒 DNA 漂出上样孔	确保已经做了步骤 9，将离心吸附柱的乙醇残留去除；或者适当提高上样缓冲液浓度。

## 接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
质粒DNA下游酶切不能切开或者酶切不完全	忘记做步骤 8, 乙醇抑制了酶切反应	做步骤 8, 然后空气中晾几分钟, 让残留乙醇挥发。
	一些硅基质膜成分一起洗脱下来, 抑制了酶切反应	将洗脱的质粒 DNA 溶液 13,000rpm 再离心一分钟, 小心取上清使用,
质粒DNA降解, 或者无质粒DNA	核酸酶活性太高	确保已经做了步骤 6, 使用去蛋白液 PE 去除了核酸酶。
混杂有基因组DNA污染	在裂解时基因组被剪切打断了	做步骤 3 时轻柔的通过颠倒混匀, <b>不要涡旋或者剧烈震荡。</b>
质粒DNA上缺口或者电泳上超螺旋带前出现变性质粒带	裂解步骤 3 时间过长	<b>裂解时间不要超过 5 分钟。</b>
产物中含有RNA污染	第一次做实验时候, 忘记将RNase A 加入 P1 溶液, RNase A 失活或者起始处理量过量	第一次实验前确保将 RNase A 加入了溶液 P1; P1 溶液超过 3 个月的, 可加入一些新 RNase A 在溶液 P1; 处理量不要过量; 菌体重悬于 P1 溶液后可放置几分钟让 RNase A 充分起作用后再进行下一步。

## 目 录

一、试剂盒组成、储存、稳定性.....	1
二、原理简介.....	2
三、试剂盒特点.....	2
四、注意事项.....	2
五、操作步骤.....	4
六、疑难解答.....	6