



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 高纯度质粒小量快速提取试剂盒
- ◆ 目录号 1203
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

高纯度质粒小量快速提取试剂盒

目录号：1203

目录编号	包装单位
120301	50次
120302	100次
120303	200次

❖ **适用范围：**

适用于小规模质粒制备（mini preparations）

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性：**

试剂盒组成	保存	50 次	100 次	200 次
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	150 µl	250 µl	500 µl
溶液 P1	4℃	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 P2	室温	15 ml	25 ml	50 ml
溶液 P3	室温	20 ml	35 ml	70 ml
去蛋白液 PE	室温	16ml	31.5 ml	63 ml
		<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>		
漂洗液 WB	室温	15 ml	25ml	50ml
		<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>		
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml	15ml	20ml
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 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. **第一次使用时,将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后(终浓度 100ug/ml)置于 2-8℃保存。**如果溶液 P1 中 RNase A 失活,提取的质粒可能会有微量 RNA 残留,在溶液 P1 中补加 RNaseA 即可。
2. 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。
3. 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。

❖ **产品介绍:**

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞,离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA,再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除,最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点:**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜,柱与柱之间吸附量差异极小,可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 独有的去蛋白液配方,可以高效去除残留的核酸酶,即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除。有效防止了质粒被核酸酶降解。
3. 快速、方便,不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂,也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好,可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。



❖ **注意事项：**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 溶液P3和去蛋白液PE中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤、眼睛和衣服**。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
3. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒，建议**接种单菌落于1.5-4.5 ml加合适抗生素的LB培养基，过夜培养14-16个小时**，可提取出多达20 μ g的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10kb的大质粒，应适当加大菌体使用量，使用5-10 ml过夜培养物，同时按比例增加P1、P2、P3的用量，其它步骤相同。
4. 得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD₂₆₀值为1相当于大约50 μ g/ml DNA。**电泳可能为单一条带，也可能为2条或者多条DNA条带**，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%**。
5. **质粒DNA确切分子大小，必须酶切线性化后**，对比DNA分子量Marker才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。
6. **洗脱液EB不含有螯合剂EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗脱，但应该确保pH大于7.5**，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在-20 $^{\circ}$ C。质粒DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)，但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。



❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶中加入指定量无水乙醇，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！

⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃ 保存。

⇒ 将溶液 P3 放在冰上预冷。

1. 取 1.5-4.5 ml 过夜培养的菌液，12,000rpm 离心 30 秒，尽可能的倒干上清，收集菌体。

收集超过 1.5 ml 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

2. 用 250μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。

如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

3. 加 250μl 的溶液 P2，温和地上下翻转 4-7 次使菌体充分裂解，室温放置 4 分钟。

温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。

4. 加 350μl 溶液 P3，立即温和地上下翻转 4-7 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。冰上静置 3-5 分钟，12,000rpm 离心 10 分钟，小心取上清。

加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

5. 将上一步所得上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液。

-
6. **可选步骤:**加入 500 μ l 去蛋白液 PE, 12,000rpm 离心 30-60 秒, 弃废液。
此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质, 如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株, 核酸酶含量丰富, 应加此步骤; 如所用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5 α 等缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 则可略过此步骤。
7. 加入 700 μ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
8. 加入 500 μ l 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
9. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 13,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, **在吸附膜的中间部位**加 100 μ l 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1 分钟。
洗脱体积越大, 洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 50 μ l, 体积小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。



❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
	<p>*忘加抗生素，非质粒转化细胞过度生长-建议：确保固体、液体培养基中都加入了适当的抗生素。</p> <p>*细菌培养时间太长，老化细菌开始裂解-建议：接种过夜培养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。</p> <p>*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。</p>
质粒 DNA 产量低	<p>*细菌培养时间过短，细菌浓度过低-建议：细菌培养到[A₆₀₀]吸光值为 2-4 时，收集菌体。</p> <p>*细菌细胞裂解不完全-建议：使用建议的菌体处理量，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细菌团块；加入裂解液 P2 后，应该是粘稠和透明的。</p> <p>*质粒 DNA 产量使用分光光度计定量不准确-建议：分光光度计定量常常偏高，使用琼脂糖电泳/EB 染色定量。</p> <p>*洗脱效率不高-建议：请阅读操作步骤 9 和注意事项 6。</p>
未提取到质粒 DNA	<p>*漂洗液 WB 中忘加无水乙醇-建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇</p> <p>*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-建议：确保已经做了步骤 9，将离心吸附柱的残留乙醇去除；或者适当提高上样缓冲液浓度。。</p>





问题	评论与建议
质粒 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*忘记做步骤 9, 乙醇抑制了酶切反应- 建议 : 做步骤 9, 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- 建议 : 将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心 1 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- 建议 : 确保已经做了步骤 6, 使用去蛋白液 PE 去除核酸酶。
基因组 DNA 污染	*裂解时基因组 DNA 被剪切打断了- 建议 : 做步骤 3 时, 轻柔颠倒混匀, 不要涡旋或者剧烈震荡 。
质粒 DNA 缺口或者电泳时超螺旋带前出现变性质粒带	*步骤 3 裂解时间过长- 建议 : 裂解时间不要超过 5 分钟 。
产物中含有 RNA 污染	*第一次做实验时, 忘记将 RNase A 加入 P1 溶液, RNase A 失活或者起始处理量过量- 建议 : 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; 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 充分作用后再进行下一步。

