



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

- ◆ 高纯度质粒小提中量试剂盒
 - ◆ 目录号 1218
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

高纯度质粒小提中量试剂盒

目录号: 1218

❖ 适用范围:

适用于5-15ml 中等规模质粒制备 (mid preparations)

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (121801)
RNase A (10mg/ml)	-20℃	250 µl
溶液 P1	4℃	25 ml
溶液 P2	室温	25 ml
溶液 P3	室温	35 ml
去蛋白液 PE	室温	16ml <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 <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
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 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 RNase A 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**取5-15 ml 过夜培养14-16个小时的菌液**，可提取出多达50 μ g-60 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，应当适当加大菌体使用量，使用10-20 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。

❖ **关于平衡液的使用**

1. **介绍:** 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37℃ 使沉淀完全消失。
2. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100μl 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ **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 5-15 ml 过夜培养的菌液，9,000rpm 离心 1-2 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。
 2. 用 500μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮，全部转入一个 2ml 离心管。**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 500μl 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 700μl 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，13,000rpm 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。

平衡液预处理吸附柱：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

5. 将上一步所得上清分次加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），13,000rpm 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，13,000rpm 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 600 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 600 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-250 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 2-5 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 80 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
质粒 DNA 产量低	*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。
	*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。
	*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。
	*细菌培养时间过短，细菌浓度过低- 建议： 细菌培养到[A ₆₀₀]吸光值为 2-4 时，收集菌体。
未提取到 质粒 DNA	*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。
	*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。
	*洗脱效率不高- 建议： 请阅读操作步骤 9 和注意事项 6。
	*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
	*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。。



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。

