

# 高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒

## 货号

PE115-200

## 产品组成

组分	规格（200 次）
RNase A（100 mg/mL）	60 μL
Buffer BL	60 mL
Buffer P1	60 mL
Buffer P2	60 mL
Buffer P3	80 mL
Buffer W1	2×72 mL
Elution Buffer	25 mL
吸附柱 EC	200 套

## 保存条件

常温（10~25℃）保存 12 个月，加入 RNase A 后的 Buffer P1 置于 2~8℃保存。

## 产品简介

本试剂盒采用改良的 SDS-碱裂解法，结合先进的硅胶膜吸附技术，可达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适用于从 1~4 mL 的细菌培养物中提取多至 20 μg 高纯度的质粒 DNA，提取的质粒 DNA 可用于酶切、PCR、测序、细菌转化、体外转录与翻译等分子生物学实验。

## 产品特点

- ◇ 操作简便：在 30 min 内可完成多个样品的质粒 DNA 提取；
- ◇ 高效：可提取菌体 85%以上的质粒 DNA。

## 适用范围

本品适用于从 1~4 mL 的细菌培养物中提取多至 20 μg 高纯度的质粒 DNA。

## 注意事项

1. Buffer P1 在使用前先加入 RNase A (试剂盒中提供的 RNase A 全部加入), 混匀后置于 2~8°C 保存;
2. 第一次使用前, 向 Buffer W1 中加入无水乙醇, 加入量参见瓶上标签;
3. 当环境温度低时, Buffer P2 中的 SDS 可能出现浑浊或析出沉淀, 将其 37°C 水浴加热几分钟即可恢复澄清, 请勿剧烈摇晃, 以免形成泡沫;
4. Buffer P3 中含刺激性溶液, 操作时要戴乳胶手套、口罩和眼镜。若沾染皮肤、眼睛应立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时及时就医;
5. 各溶液使用后请立即盖紧盖子;
6. 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、质粒的稳定性等因素有关。

## 使用方法

1. 向吸附柱 EC 中加入 250  $\mu$ L Buffer BL, 12,000  $\times$ g 离心 1 min, 活化硅胶膜;
2. 取 1~4 mL 过夜培养的菌液, 12,000  $\times$ g 离心 1 min, 收集菌体, 尽量吸除上清;
3. 加入 250  $\mu$ L Buffer P1 (请先检查是否已加入 RNase A) 重悬菌体沉淀 (若菌体沉淀未彻底悬浮会影响裂解效果, 导致提取得率和纯度偏低), 涡旋震荡至无菌块为止;
4. 加入 250  $\mu$ L Buffer P2, 温和地上下翻转 6~8 次, 使菌体充分裂解;

**注意:** 此步需要温和翻转, 不能剧烈震荡, 以免打断基因组 DNA, 使提取的质粒中含有基因组 DNA 片段。混合后菌体应变得清亮粘稠, 若未变得清亮, 可能是由于菌体量过多, 裂解不充分导致, 应减少菌体量。

5. 加入 350  $\mu$ L Buffer P3, 温和地上下翻转 6~8 次, 充分混匀 (此时会出现白色絮状沉淀), 12,000  $\times$ g 离心 10~15 min;
6. 小心吸取上清, 将上清转入吸附柱 EC 中 (注意不要吸出沉淀), 12,000  $\times$ g 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱 EC 放回空收集管;
7. 在吸附柱 EC 中加入 700  $\mu$ L Buffer W1 (请先检查是否已加入指定体积的无水乙醇) 12,000  $\times$ g 离心 1 min, 弃废液;
8. 重复步骤 7;
9. 将吸附柱 EC 放回空收集管中, 12,000  $\times$ g 离心 2 min;
10. 取出吸附柱 EC, 放入干净的 1.5 mL 离心管中, 20~25°C 静置 2 min, 使残留的乙醇挥发。在吸附膜的中间部位加入 35~50  $\mu$ L Elution Buffer (60~65°C 预热 Elution Buffer 效果更好), 20~25°C 静置 2 min, 12,000  $\times$ g 离心 2 min。如需较多量 DNA, 可将得到的溶液重新转入吸附柱 EC 中, 离心 2 min。

**注意:** 洗脱体积越大, 洗脱得率越高, 如需得到较高浓度的 DNA, 可以适当减少洗脱体积, 但最小体积

不应少于 25  $\mu\text{L}$ ，体积过小会降低 DNA 洗脱得率，降低产量。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，建议 ddH<sub>2</sub>O 洗脱，并保证其 pH 值在 7.0~8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在 -20°C，以防 DNA 降解。

## 常见问题与解决办法

### Q1：质粒 DNA 产量低？

#### A1：

- 1) 质粒拷贝数低。载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2 ~3 倍的产量波动（每毫升培养过夜的菌液，高拷贝数的质粒载体产量为 3 - 16  $\mu\text{g}$ ）。长片段质粒和表达型载体常以中低拷贝数为主，每毫升菌液的产量约为 0.5~2  $\mu\text{g}$ ；
  - 低拷贝质粒：pBR322, pACYC 及其衍生载体，pSC101 及其衍生载体，SuperCos, pWE15；
  - 高拷贝质粒：pTZ, pUC, pBS, pGM-T。
- 2) 菌种问题。菌种保存过程中存在质粒丢失现象，培养细菌前最好先划线活化，以稳定产量；
- 3) 细菌未充分裂解。细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量；
- 4) 试剂准备有误。Buffer P2 若有沉淀析出需加热溶解，Buffer W1 加入乙醇体积不准确；
- 5) 洗脱效率低。将 Elution Buffer 预热至 60~65°C，并进行二次洗脱。

### Q2：质粒 DNA 中有基因组 DNA 污染？

#### A2：

- 1) 菌液培养时间太长。菌液培养时间需控制在 12 ~16 h；
- 2) 裂解问题。加入 Buffer P2 时，必须轻柔颠倒混匀；处理多个样品时，加入 Buffer P2 时算起，总时间不要超过 5 min。