

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°C）保存 12 个月，加入 RNase A 后的 Buffer P1 置于 2~8°C 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 μL Buffer BL, 12,000 ×g 离心 1 min, 活化硅胶膜;
2. 取 1~4 mL 过夜培养的菌液, 12,000 ×g 离心 1 min, 收集菌体, 尽量吸除上清;
3. 加入 250 μL 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 μL 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 μL 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 ×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 ×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 μL Buffer W1 (请先检查是否已加入指定体积的无水乙醇) 12,000 ×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 ×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 μL Elution Buffer (60~65°C 预热 Elution Buffer 效果更好), 20~25°C 静置 2 min, 12,000 ×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 μL , 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 ddH₂O 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 μg)。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 μg ;
 - 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。