

## 快速质粒小量提取试剂盒

货号：DP101-01

规格：50次

保存：15-25℃

### 【产品概述】

快速质粒小提试剂盒采用改良的碱裂解—中和法，结合硅胶膜吸附技术，使质粒 DNA 获得高效、专一的吸附。经过两步洗涤，清除基因组 DNA、RNA、蛋白质及其他杂质，被吸附的质粒 DNA 随后被低盐缓冲液从离心吸附柱上洗脱下来。本试剂盒适宜从常规克隆菌株中提取 20 kb 以下的质粒，操作快速方便，单个样品可在 25 min 内完成，20 个样品只需 45 min 完成；从 4 ml 过夜培养（≤16 小时）的菌液中通常可提取出 10-20 μg 的高拷贝质粒 DNA，其中超螺旋结构占 90%以上，可直接用作荧光测序的模板，以及 PCR、酶切、连接、转化、体外转录等常规分子生物学实验。

### 【产品组分】

货号	组分	体积
DP101-101	细胞悬浮液S1（初次使用前请按瓶标说明加入 RNase A，于 2-8℃保存）	15 ml
DP101-102	细胞裂解液S2（用毕立即盖紧瓶盖；如有结晶析出，37℃水浴加热助溶）	15 ml
DP101-103	中和缓冲液S3（有刺激性，请勿直接接触皮肤）	20 ml
DP101-104	浓缩漂洗液WB（初次使用前请按瓶标说明加入无水乙醇混匀）	20 ml
DP101-105	洗脱缓冲液（EB）	5 ml
DP101-106	柱平衡液BL（请使用当天平衡液处理过的吸附柱）	30 ml
DP101-107	RNase A 溶液（10 mg/ml）室温保存 6 个月，-20℃长期保存	150 μl
DP101-108	离心吸附柱及收集管	50套
DP101-109	1.5 ml 无菌离心管	50个

### 【保存条件】

常温运输，室温（15-25℃）保存，有效期一年。如需长期保存，可将各试剂组分置于 2-8℃，使用时如发现结晶，可于 37℃ 水浴加热助溶。离心吸附柱不建议低温或>30℃保存，否则影响吸附效率。加入 RNase A 的细胞悬浮液（S1）可于 2-8℃保存6 个月，如发现提取的质粒中有 RNA 污染，可向 S1 溶液中补加适量的 RNase A。

### 【实验准备】

- 用户需自行准备的材料：含适当抗生素的 LB 培养基，无水乙醇，台式离心机。
- 初次使用本试剂盒，请按瓶标说明向细胞悬浮液（S1）中加入 RNase A 溶液，向浓缩漂洗液（WB）中加入无水乙醇（用户自备），并在试剂瓶上做标记。

### 【操作步骤】

本实验方法适用于从 1-5 ml 过夜培养的大肠杆菌菌液中提取质粒。提取量受菌株、质粒拷贝数、菌液体积和培养时间、培养基类型等因素的综合影响。

- 柱平衡：**向离心吸附柱中加入 500 μl 柱平衡液（BL）静置 1 min，室温下≥12000 rpm 离心 1 min，弃除收集管中的液，将离心吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的吸附柱）
- 收菌：**将1-5 ml 过夜培养（37℃，12-16 小时）的菌液于室温≥10,000 rpm 离心 1-2 min，彻底弃除上清。  
*注意：菌液用量过大不仅不能增加质粒产量，反而会因裂解不全或杂质封闭硅胶膜而降低产量；培养时间不宜过长，否则会增加开环结构质粒的比例。*
- 重悬：**加入 250 μl 含 RNase A 的细胞悬浮液（S1）充分混悬振荡或用枪头反复吹打使细菌彻底分散悬浮。
- 裂解：**加入 250 μl 细胞裂解液（S2）轻轻上下颠倒混合 5 次，室温静置 1-5 min，待细菌充分裂解，溶液变半透明。  
*注意：避免剧烈振荡导致基因组 DNA 裂解；裂解时间不能超过 5 min。*
- 中和：**加入 350 μl 中和缓冲液（S3）轻轻上下颠倒混合 5 次，充分混匀，避免剧烈振荡。室温下≥12,000 rpm 离心 10 min。
- DNA 结合：**小心吸取上清，转移到插入收集管的离心吸附柱内，室温下≥12,000 rpm 离心 1 min，弃除收集管中的废液，将离心吸附柱重新插回收集管中
- 清洗：**加入 500 μl 漂洗液（WB，请确认已加入乙醇！）于离心吸附柱中，室温下≥12,000 rpm 离心 30 sec，弃除收集管中的废液，将离心吸附柱重新插回收集管中。



**8. 再次清洗:** 加入 500  $\mu$ l 漂洗液 (WB) 于离心吸附柱中, 室温下  $\geq 12,000$  rpm 离心 30 sec, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新插入收集管中。将离心吸附柱去盖再次离心 2 min, (如图示方向您只需用手轻轻一拉, 管盖即会自然轻松脱落) 彻底除去残余漂洗液。

**9. 洗脱:** 小心取出离心吸附柱, 将其套入一个 1.5 ml 无菌离心管中。向硅胶吸附膜的中央加入 100  $\mu$ l 洗脱缓冲液 (EB) 室温放置 1 min 后,  $\geq 12,000$  rpm 离心 1 min 收集质粒 DNA。

注意: 为提高质粒浓度, 最低可使用 30  $\mu$ l 的 EB 溶液, 离心收集后可将洗脱的质粒溶液再次加入离心吸附柱中重复洗脱; 使用 100  $\mu$ l EB 溶液则无需二次洗脱; 对 6 kb 以上的质粒, 可使用预先加热至 55  $^{\circ}$ C 的 EB 溶液洗脱以提高产量; EB 溶液不含 EDTA, 故不会影响荧光测序等后续反应; 如必须使用无菌去离子水洗脱, 需注意其 pH 值是否接近中性, 否则应使用 NaOH 溶液将 pH 值调节至 7.0-8.5 之间。

**10. 储存:** 弃除离心吸附柱, 纯化的质粒可直接用于后续反应或于 -20  $^{\circ}$ C 长期保存。

注意: 经检测, 本试剂盒从 endA<sup>-</sup> 菌株 (如 DH5<sup>-</sup>, TOP10, XL-blue 等) 中提取的质粒反复冻融 20 次无降解; 如需在 4  $^{\circ}$ C 长期保存或者保存从 endA<sup>+</sup> 菌株 (如 JM109, HB101, BL21 等) 中提取的质粒, 可向每 100  $\mu$ l 质粒溶液中加入 11  $\mu$ l 的 10 $\times$  TE 溶液, 但含 EDTA 的质粒溶液不可用作荧光测序模板。

### 【质粒小量提取常见问题分析及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
无质粒	未加抗生素或抗生素失效导致质粒丢失	确保培养基含有正确、有效的抗生素
	质粒拷贝数量低	提取低拷贝质粒需收集较多菌液 (不超过 10 ml) 或采用添加氯霉素方法促使质粒复制
	浓缩漂洗液 (WB) 中未添加乙醇	按照说明书指定方法添加乙醇并做标记后使用漂洗液
产量低	未使用平衡液 (BL)	请按步骤使用平衡液 (BL) 平衡液 (BL) 可改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性, 提高 DNA 片段回收效率
	未加抗生素或抗生素失效导致质粒丢失	确保培养基含有正确、有效的抗生素
	培养时间过短或过长	37 $^{\circ}$ C 孵育 12-16 h 后收集菌液; 培养时间过长可能导致菌体裂解, 质粒丢失
	质粒拷贝数量低	提取低拷贝质粒需收集较多菌液 (不超过 10 ml) 或采用添加氯霉素方法促使质粒复制
	浓缩漂洗液 (WB) 中未添加乙醇	按照说明书指定方法添加乙醇并做标记后使用漂洗液
	洗脱溶液 pH 值不合适	使用试剂盒提供的洗脱缓冲液 (EB) 如用水洗脱, 需将 pH 值调至 7.0-8.5 范围; 对 6 kb 以上的质粒, 可将洗脱缓冲液加热至 55 $^{\circ}$ C 有助于提高洗脱效率
	洗脱溶液体积过小	使用 30 $\mu$ l 以上的洗脱溶液, 加至硅胶膜的中央, 静置 1 min, 使膜完全浸润后再离心
测序结果不佳	DNA 测序用量过低或过高	调整测序反应使用的 DNA 量。质粒浓度过低, 可通过乙醇沉淀浓缩产物; 浓度过高, 则需要进行稀释。定量方法应采用电泳染色检测定量
	TE 缓冲液干扰测序结果	使用无 DNA 酶污染的洗脱缓冲液 (EB) 或灭菌双蒸水溶解 DNA 作为测序模板
酶切效果不佳	酶的质量低劣或使用方法不当	按照厂家说明书正确使用酶; 设立阳性对照检测内切酶活性
	漂洗液 (WB) 去除不彻底, 质粒中残留有乙醇或盐	开盖或真空处理, 使残留乙醇挥发; 漂洗液二次洗涤完毕后, 应再次离心 1-2 min, 以彻底去除残留乙醇
基因组 DNA 污染	裂解或中和步骤因剧烈振荡导致基因组 DNA 断裂	裂解和中和步骤应轻柔颠倒混合, 避免涡旋振荡
RNA 污染	细胞悬浮液 (S1) 中未添加 RNase A 溶液或未低温保存	初次使用本试剂盒时应将试剂盒提供的 RNase A 溶液全部加入细胞悬浮液中, 使用后于 2-8 $^{\circ}$ C 保存该试剂; 保存时间超过 6 个月, 可补加少量 RNase A
质粒断裂	裂解时间过长导致质粒断裂	细胞裂解过程应控制在 5 min 以内

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 承诺为您更换等量合格产品, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。