

快速质粒小提试剂盒

SpeedyPure Plasmid Extraction Kit (Mini)

BH32001

使用说明书

Version 1.00



目录

01/产品概述.....	1
02/产品组分.....	1
03/保存条件.....	1
04/适用范围.....	1
05/自备材料.....	1
06/注意事项.....	2
07/实验流程图.....	2
08/实验流程.....	3
09/常见问题与解决方案.....	4

01/产品概述

取过夜培养的菌液 1~5 ml, 采用 SDS-碱裂解法裂解细菌, 多个样品的质粒提取工作用时约 30 min。提取过程未使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等步骤, 质粒得率高。利用离心吸附柱 (硅基质膜) 在高盐、低 pH 状态下可以高效特异的结合质粒 DNA 的原理, 质粒 DNA 被吸附在离心柱的硅基膜上, 再经过洗杂液将非特异吸附的蛋白质、宿主基因组、RNA 等杂质去除, 最后使用低盐、高 pH 的洗脱缓冲液将质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱获得纯净的质粒样品, 每个吸附柱可吸附高达 50 μ g 的质粒 DNA。纯化的质粒 DNA 可直接用于酶切、PCR、测序、转化、转染等一些常规的分子生物学实验。

02/产品组分

组分	100 rxns
RNaseA	330 μ L
Buffer S1	30mL
Buffer S2	30mL
Buffer N3	40mL
Buffer PW1	60 mL
Buffer PW2	2*20mL
Elution Buffer	20mL
Spin Columns (each in a 2mL collection tube)	100个

RNase A: 酶解样品中的 RNA;

Buffer S1: 细菌悬浮液

Buffer S2: 细菌裂解液

Buffer N3: 中和液

Buffer PW1: 去除质粒中的蛋白等杂质

Buffer PW2: 去除质粒中的盐离子残留

Elution Buffer: 洗脱液

Spin Columns: 质粒 DNA 吸附离心柱

Collection Tubes 2 ml: 滤液收集管

03/保存条件

RNase A, -30 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存, 室温运输; 其他组分 15~25 $^{\circ}$ C 保存, 室温运输。

加入 RNase A 后 Buffer S1 放置于 2~8 $^{\circ}$ C

04/适用范围

本产品适用 1~5 ml 过夜培养的菌液 (发酵罐高密度培养样品需降低处理量)。处理低拷贝质粒时, 按菌液量等比例扩大 Buffer S1、Buffer S2 和 Buffer N3 的用量, 可处理菌液量 5~10 ml。

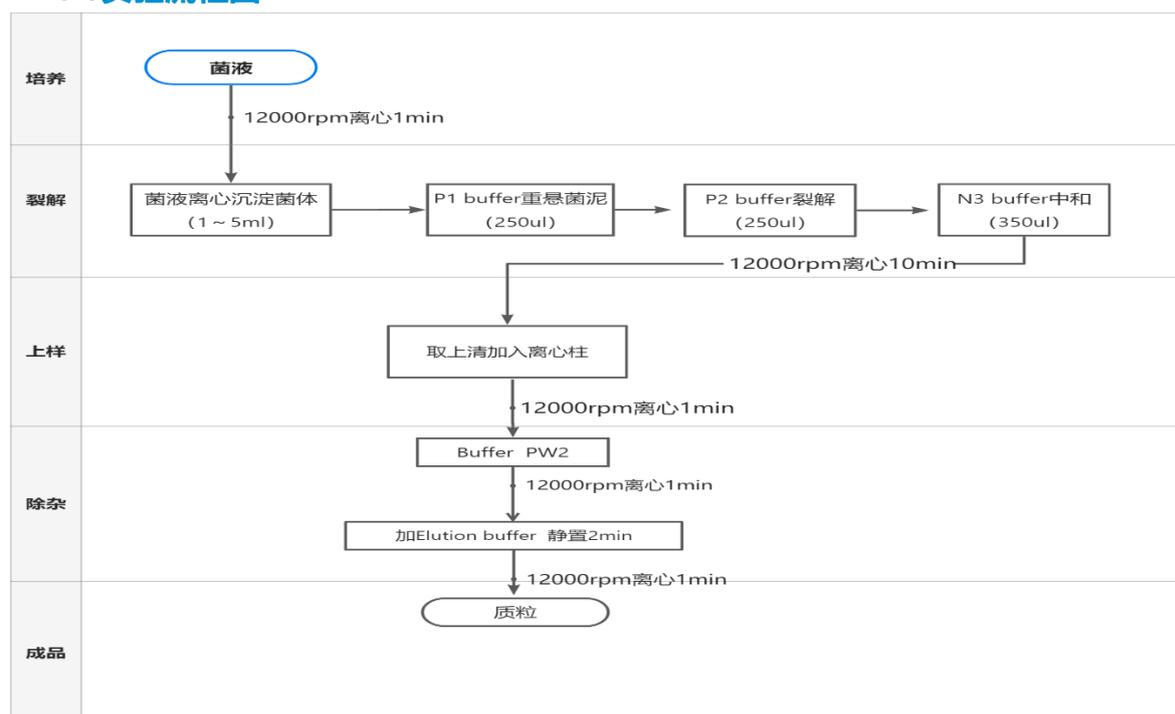
05/自备材料

无水乙醇、1.5 ml 灭菌离心管。

06/注意事项

1. 首次使用前将 RNase A 溶液全部加入至 Buffer S1 中，置于 2~8℃保存。
2. 首次使用前按 Buffer PW2 瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
3. 若低温保存时，Buffer S2、Buffer N3 和 Buffer PW1 溶液容易产生白色沉淀，部分地区在冬季 Buffer S2 室温放置时容易产生沉淀，若溶液中产生了沉淀使用前需要将其放置在较为温暖的环境中，必要时可在 37℃水浴锅中预热使沉淀完全溶解，混匀后再使用。
4. 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。
5. Buffer PW1 可以有效去除残留的宿主蛋白杂质，当宿主菌为 endA+(TG1、BL21、HB101 ET12567、JM 系列)等核酸酶含量较高的菌株时，必须使用 Buffer PW1。
6. 处理低拷贝质粒时，按比例扩大 Buffer S1、Buffer S2 和 Buffer N3 的用量，将菌液体积提升至 5~10 ml。
7. 注意不要直接接触 Buffer S2、Buffer N3 和 Buffer PW1，使用应戴手套，使用后应立即盖紧盖子。
8. 实验流程的 5、6、7、8、10 步骤的离心过程可以使用掌上 EP 管离心机完成。

07/实验流程图



08/实验流程

1. 取 1~5 ml 过夜培养(12~16 h)的菌液, 加入离心管中(自备), 12,000 rpm(13,400 × g)离心 1 min。弃培养基, 将离心管倒扣于吸水纸上吸尽残液。

2. 向装有菌体沉淀的离心管中加入 250 μl Buffer S1(**请先检查 Buffer S1 是否已经加入 RNase A**), 用移液器吹打或者涡旋仪振荡混匀。

◆ 充分重悬细菌对得率及纯度很关键, 重悬后应看不到细菌聚集成块。若有菌块会影响裂解效果, 导致得率和纯度偏低。

3. 向步骤 2 中加入 250 μl 的 Buffer S2, 温和的上下颠倒混匀 8~10 次, 使菌体充分裂解。

◆ 颠倒混匀时力度要轻。涡旋及剧烈振荡会使基因组 DNA 断裂, 造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。此时溶液变得粘稠而透亮, 表明细菌已充分裂解。所用时间不要超过 5 min, 以免质粒受到破坏。如若溶液未变的透亮, 可能是由于菌体过多导致裂解不充分, 需要适当减少菌量。

4. 向步骤 3 中加入 350 μl 的 Buffer N3, 立即温和地上下颠倒 8~10 次彻底中和 Buffer S2。此时应出现白色絮状沉淀。12,000 rpm(13,400 × g)离心 10 min。

◆ Buffer N3 加入后应立即颠倒混匀, 以防止仅在局部产生沉淀而影响中和效果。若上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

5. 将 Spin Columns 吸附柱(已套装于 2 ml 收集管中)置于管架。用移液器小心吸取步骤 4 上清转移至 Spin Columns 吸附柱中, 注意不要吸到沉淀。使用掌上离心机离心使柱内液体全部离心至收集管中(或 12000rpm 离心 1min)。倒掉收集管中的废液, 把吸附柱重新放回收集管中。

6. (**可选**)加入 500 μl Buffer PW1 至吸附柱中。使用掌上离心机离心使柱内液体全部离心至收集管中(或 12,000rpm 离心 1min)。弃废液, 把吸附柱重新放回收集管中。

◆ 如果宿主菌是 end A+(TG1, BL21, HB101, JM 系列, ET12567 等), 这些宿主菌含有大量的核酸酶, 易降解质粒 DNA, 需要采用此步。如果宿主菌是 endA-宿主菌(DH5α, TOP10 等), 此步可省略。

7. 加入 600 μl Buffer PW2(请检查是否已用无水乙醇稀释)至吸附柱中。使用掌上离心机离心使柱内液体全部离心至收集管中(或 12,000rpm 离心 1min)。弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

8. 重复步骤 7

9. 将吸附柱放回收集管中。12,000 rpm(13,400 × g)离心 1 min 干燥吸附柱, 目的是将吸附柱中残留的洗杂液彻底去除。

洗杂液中的乙醇残留会影响如酶切、酶链、PCR 等实验。此步骤不可省略。

10. 把吸附柱置于一个新的无菌的 1.5 ml 离心管中。加入 30 ~ 100 μ l Elution Buffer 至柱吸附柱的膜中央。室温静置 2 ~ 5 min, 使用掌上离心机离心使柱内液体全部离心至收集管中 (或 12,000rpm 离心 1min) 洗脱 DNA。

◆ 洗脱体积不应少于 30 μ l, 低于 30 μ l 会导致洗脱效率下降。若需要获得最高产量, 将 Elution Buffer 预热至 55 $^{\circ}$ C 提高洗脱效率。必要时可以多次洗脱或可将离心得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 重复步骤 10。若后续做测序需使用 ddH₂O 洗脱, 并确保 ddH₂O 的 pH 在 7.0 ~ 8.5 范围内, pH 低于 7.0 会降低洗脱效率。

11. 洗脱的 DNA 产物用于下一步实验或者保存于 -20 $^{\circ}$ C。

09/常见问题与解决方案

◆ 低拷贝质粒或大质粒 (>10 kb) 提取

若所提质粒为低拷贝数质粒或是大于 10 kb 的质粒, 应加大菌体使用量, 使用 5 ~ 10 ml 过夜培养的菌液, 同时按照比例增加 Buffer S1、Buffer S2、Buffer N3 的用量, 洗脱缓冲液 Elution Buffer 应在 55 $^{\circ}$ C 水浴锅预热, 同时在吸附和洗脱时可以适当的延长时间, 可以增加得率。其它步骤一致。

◆ DNA 产量低

质粒拷贝数: 载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体每毫升培养过夜的菌液, 高拷贝数的质粒载体产量为 3 ~ 16 μ 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 μ g。

● 低拷贝质粒: pBR322, pSC101 及其衍生载体, pACYC 及其衍生载体, SuperCos, pWE15。

● 高拷贝质粒: pBS, pTZ, pGM-T, pUC。

菌种问题: 菌种保存过程中会有质粒丢失现象, 培养细菌前最好先涂板 (或划线) 活化, 以稳定产量。

细菌未充分裂解: 细菌须在 Buffer S1/RNase A 中充分重悬, 成团成块的细菌因无法裂解会降低产量。

试剂准备有误: Buffer S2 若有沉淀析出需加热溶解后使用。Buffer PW2 加入乙醇体积不准确 (乙醇浓度需控制在 80%)。Buffer S1 中未添加 RNase A。

长片段质粒 DNA: 长片段质粒常以中低拷贝数为主, 可提升菌液用量至 10 ml 以提高产量。将 Elution Buffer 预热至 55 $^{\circ}$ C, 并重复二次洗脱。

培养时间: 菌液培养时间需控制在 12 ~ 16 h, 时间过短菌量较少, 培养时间过长会因营养匮乏等不利因素造成质粒丢失。

菌株/菌株老化: 筛选适宜的菌株。控制传代次数。

裂解问题: 加入 Buffer S2 时, 必须轻柔颠倒混匀; 处理多个样品时, 加入 Buffer S2 时算起, 总时间不要超过 5 min。

◆ 下游实验结果不理想

盐污染：确保用 Buffer PW2 洗涤两次。

乙醇污染：在最后一次 Buffer PW2 洗涤后可将吸附柱离心时间由原来 1 min 增加至 2 min。

质粒降解：用 endA+的菌株如 HB101 或其它野生型菌株，含有高丰度的核酸酶，必须使用

Buffer PW1 去除蛋白杂质。



武汉滨会生物科技股份有限公司
Binhui Biopharmaceutical Co., Ltd.
<http://www.binhui-bio.com>
Tel: 027-87326962
Sales: binhui@binhui-bio.com
Support: binhui@binhui-bio.com
Service: binhui@binhui-bio.com



扫码了解更多