

MeiLun Mini Plasmid Kit

质粒小提试剂盒

(离心柱型)

产品编号: MA0007 规格: 50T 200T

产品内容

产品组成	MA0007-1 (50 preps)	MA0007-2 (200 preps)
Buffer I	15 ml	60 ml
Buffer II	15 ml	60 ml
Buffer III	20 ml	80 ml
Buffer DW	30 ml	120 ml
Buffer PW	15 ml	30 ml×2
Buffer EB	8 ml	35 ml
RNase A (10 mg/ml)	150 µl	600 µl
纯化套件 (吸附柱+收集管)	50 套	200 套

保存方法

1. 本试剂盒于常温 (15-25°C) 运输, 室温 (15-25°C) 干燥条件下, 可保存 12 个月, 更长时间的保存可置于 2-8°C。
2. 温度较低时, 有的溶液可能产生沉淀, 使用前在 37°C 水浴中加热, 直至沉淀消失。
3. 第一次使用前将 RNase A 加入 Buffer I 中, 混匀后置于 2-8°C 保存, 有效期为半年。
4. RNase A 在室温可稳定保存 6 个月以上, 长期保存需存放于 -20°C。

产品简介

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞, 通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA。本产品采用新型的吸附材料, 高效、专一吸附 DNA。本产品适用于提取 1-5 ml 过夜培养的菌液, 操作过程快速、方便, 无需苯酚抽提、乙醇沉淀等步骤, 整个提取过程可在 20 分钟内完成。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染等各种常规实验。

操作步骤

使用前请先在Buffer PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 接种目标菌株于含合适抗生素的培养基中，37°C摇床振荡培养12-16 h。
2. 取1-5 ml过夜培养的菌液，加入离心管中，室温12,000 rpm离心1 min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
3. 在菌体沉淀中加入250 µl Buffer I（请先检查是否已加入RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

注意：一定要彻底悬浮菌体，否则会影响裂解，导致得率和纯度偏低。

4. 加入250 µl Buffer II，立即温和颠倒离心管6-8次，使菌体充分裂解。

注意：温和混合，不可剧烈震荡，以免打断基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。如果菌液未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

5. 加入350 µl Buffer III，立即温和颠倒离心管6-8次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。

注意：Buffer III加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。

6. 室温12,000 rpm离心10 min，将上清液全部小心移入吸附柱P1中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀。室温12,000 rpm离心30 s，倒掉收集管中的液体，将吸附柱P1放入收集管中。

注意：吸附柱的最大有效容积为750 µl，如果裂解液较多，可多次加入裂解液，直至全部流过吸附柱。

7. （可选步骤）向吸附柱P1中加入500 µl Buffer DW，室温12,000 rpm离心30 s，倒掉收集管中的液体，将吸附柱P1重新放回收集管中。

对于宿主菌是end A+宿主菌（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，推荐采用此步。

对于宿主菌是end A-宿主菌（DH5α，TOP10等），此步可省略。

8. 向吸附柱P1中加入600 µl Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），室温12,000 rpm离心30 s，倒掉收集管中的液体，将吸附柱P1放入收集管中。

注意：Buffer PW（50T）中加入60ml无水乙醇。Buffer PW（200T）中加入120 ml无水乙醇。

9. 重复步骤8一次。

10. 将吸附柱P1放入收集管中，室温12,000 rpm离心1 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续酶反应实验。为确保下游实验免受影响，建议将吸附柱P1开盖，于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

11. 将吸附柱P1置于一个干净的离心管中，向吸附膜中央加入50-100 µl Buffer EB，室温静置2 min，12,000 rpm离心1 min，将质粒溶液收集到离心管中，-20°C保存或用于后续试验。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于50 µl，体积过小影响回收效率。

洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用ddH₂O做洗脱液，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。DNA产物应保存在-20°C，以防止DNA降解。

为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温静置2 min，12,000 rpm离心1 min，将质粒溶液收集到离心管中。

低拷贝或大质粒 (>10 kb) 提取

如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10 kb的大质粒，应加大菌体使用量，使用5-10 ml过夜培养物，同时按照比例增加Buffer I、II、III的用量，Buffer EB应在65-70°C水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。

常见问题解答

1. 未提质粒或质粒得率较低

- A. 大肠杆菌老化。请涂布平板培养后，重新挑选单菌落进行液体培养。
- B. 质粒拷贝数低。可使用更多的菌量，同时相应增加溶液使用量。
- C. 碱裂解不充分。使用菌体过多，导致裂解不充分，可减少菌体用量或增加Buffer I、II和III的用量。
- D. 溶液失效。Buffer II长期暴露在空气中易失效，请每次使用完后，立即盖紧瓶塞。
- E. 质粒洗脱不完全。质粒洗脱时，可适当加温（37-70℃）或延长溶解时间，对大质粒效果更为明显。
- F. 乙醇残留。漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体，再加入洗脱缓冲液。
- G. 洗脱液加入位置不正确。洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面，达到最大洗脱效率。
- H. 洗脱液不合适。洗脱效率与洗脱液的pH值有关，请确保洗脱液pH>7.0。
- I. 洗脱时间过短。洗脱时放置1分钟以上可达到较好的效果。如果是低拷贝质粒或质粒大于8 kb时，可以分两次洗脱，对于大的质粒延长放置时间，让DNA完全溶解后再洗脱，可提高洗脱效率。

2. 质粒纯度不高

- A. 混有蛋白。不要使用过多菌体。Buffer III处理离心后，溶液应为澄清的，如果混有微小蛋白悬浮物，可再次离心，并延长离心时间，完全沉淀蛋白后再取上清加入吸附柱中。
- B. 混有RNA。RNase A处理不彻底。减少菌体用量或加入Buffer III后延长放置时间5-10分钟。如果Buffer I已保存6个月以上，请在其中再添加终浓度为100 µg/ml 的RNase A。
- C. 混有基因组DNA。细菌培养时间过长会导致DNA的降解，培养时间不要超过16小时。Buffer II加入后应温和混匀，如果剧烈震荡，可能将基因组DNA打断，从而混杂在质粒中。如果加入Buffer II后过于黏稠，无法温和混匀，请减少菌体用量。
- D. 提取质粒的菌株为含有大量核酸酶的宿主菌。对于这些宿主菌请在操作过程中使用Buffer DW。
- E. 质粒的二聚体和多聚体形式。质粒复制过程中形成的，与宿主菌相关，电泳可检测出多条条带，单酶切处理后可变成单一条带。

3. 质粒 DNA 测序结果不佳

- A. 模板DNA加量不准。请对质粒DNA正确定量。使用吸光度值定量时，有时DNA溶液中的不纯物会影响吸光度值的测定，此时建议使用琼脂糖凝胶电泳法进行定量。
- B. 质粒DNA纯度不好。应严格遵守实验操作要求，使用新鲜菌体培养液提取质粒。

- C. 进行DNA洗脱时用灭菌蒸馏水洗脱。
- D. DNA插入片段本身立体结构复杂，难以测序，应改进测序方法。