

质粒小量提取试剂盒

(Plasmid Miniprep Kit)

目录号: ZP101 版本: 2025-05-14

试剂盒内容:

| 试剂盒组成 | ZP101-1 (50 次) | ZP101-2 (100 次) | ZP101-3 (200 次) |
|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| RNaseA (10 mg/ml) | 150 μl | 300 μl | 600 μl |
| 平衡液 ZBL | 15 ml | 30 ml | 60 ml |
| 溶液 1 | 15 ml | 30 ml | 60 ml |
| 溶液 2 | 15 ml | 30 ml | 60 ml |
| 溶液 3 | 20 ml | 40 ml | 80 ml |
| 去蛋白液 W1 | 30 ml | 60 ml | 120 ml |
| 漂洗液 W2 | 15 ml | 2×15 ml | 2×30 ml |
| 洗脱缓冲液 TE | 15 ml | 15 ml | 30 ml |
| 吸附柱 | 50 个 | 100 个 | 200 个 |
| 收集管 (2 ml) | 50 个 | 100 个 | 200 个 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 | 1 份 |

储存条件:

本试剂盒在室温(15-25°C)干燥条件下, 可保存1年; 更长时间的保存可置于2-8°C。若溶液产生沉淀, 应在使用前置于37°C下溶解沉淀。单独包装的RNase A在-20°C可稳定保存1年以上。加入RNase A后的溶液1应置于2-8°C保存, 可稳定

产品简介:

本试剂盒采用碱裂解法裂解抽提细菌质粒, 再利用质粒DNA吸附柱在高盐条件下特异性地结合DNA的特性分离纯化质粒。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料, 高效、专一吸附DNA。本说明书操作步骤适用于从1-5 ml过夜培养的大肠杆菌LB (Luria-Bertani) 培养液中, 快速提取多至40 μg纯净的高拷贝质粒DNA。

使用本试剂盒提取的质粒DNA可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译等。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 按1: 100的比例向溶液1中加入RNaseA, 混匀, 置于2-8°C保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液W2中加入无水乙醇。
3. 使用前请先检查溶液2和溶液3是否出现浑浊, 如有浑浊现象, 可在37°C水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清。
4. 注意不要直接接触平衡液ZBL、溶液2和溶液3, 使用后应立即盖紧盖子。
5. 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心, 速度为12,000 rpm (13,400×g)。
6. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
7. 去蛋白液W1可以有效去除残留的蛋白污染, 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, 强烈推荐使用去蛋白液W1。
8. 去蛋白液W1可能会影响实验得率, 因此如果宿主菌非上述提及的名称, 可省略此步骤。

操作步骤：

1. **柱平衡处理：**向吸附柱中加入250 μ l 平衡液ZBL, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心1min, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱重新放回收集管中。(处理过的柱子尽量在1小时内使用, 如果处理时间过长可再次加平衡液ZBL处理)

注：1、此步骤也可在第5步并行操作离心, 即提取液加入吸附柱前平衡柱子即可。

2、柱平衡可充分激活硅基质膜, 提高得率; 平衡好的吸附柱放置时间超过1小时, 效果将有所下降, 建议再次处理后使用, 但不建议处理2次以上。

2. **收集菌体：**取1-5 ml 过夜培养的菌液, 加入离心管中, 使用常规台式离心机, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心1分钟, 保留沉淀, 尽量吸除上清。(菌液体积大于离心管, 可以多次离心将菌体收集到一个离心管中)。

3. **重悬菌体：**向留有菌体沉淀的离心管中加入250 μ l 溶液1 (请先检查是否已加入RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

注意：如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。

4. **裂解菌体：**向离心管中加入250 μ l 溶液2, 温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。

注意：温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免打断基因组DNA, 造成提取的质粒中混有基因组DNA片断。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过5分钟, 以免质粒受到破坏。如果未变得清亮, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应适当减少菌体量。

5. **沉淀除杂：**向离心管中加入350 μ l 溶液3, 立即温和地上下翻转6-8次, 充分混匀, 即出现白色絮状沉淀。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心10分钟, 此时在离心管底部形成沉淀。

注意：溶液3加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

6. **吸附纯化：**将上一步收集的上清液用移液器转移到平衡好的吸附柱中 (吸附柱放入收集管中), 注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30-60秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

7. **可选步骤：**向吸附柱中加入500 μ l 去蛋白液W1, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心30-60秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

如果宿主菌是end A⁺宿主菌 (TGI, 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。

此步聚可能会影响质粒的得率, 如果宿主菌是endA-宿主菌 (DH5 α , TOP10等), 这步可省略。

8. **一漂：**向吸附柱中加入600 μ l 漂洗液W2 (请检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心20秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

9. **二漂：**向吸附柱中加入500 μ l 漂洗液W2, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心20秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

10. **空离：**将吸附柱放入收集管中, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心2分钟, 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的酶反应 (酶切、PCR等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 建议将吸附柱开盖, 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

11. **洗脱：**将吸附柱置于一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位滴加80-150 μ l 洗脱缓冲液TE, 室温放置1分钟, 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心1分钟将质粒溶液收集到离心管中。

注意：为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 重复步骤11。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液, 应保证其pH值在7.5-8.5范围内(可以用NaOH将水的pH值调到此范围), pH值低于7.0会降低洗脱效率。

洗脱缓冲液体积不应少于60 μ l, 体积过小影响回收效率。且DNA产物应保存在-20°C, 以防DNA降解。

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10kb的大质粒, 应加大菌体使用量, 使用5-10 ml 过夜培养物, 同时按照比例增加溶液1、2、3的用量, 洗脱缓冲TE应在65-70°C水浴预热, 吸附和洗脱时可以适当延长时间, 以增加提取效率。其它步骤相同。