

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 μ l	300 μ l	600 μ l
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 \times 15 ml	2 \times 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℃)干燥条件下,可保存1年;更长时间的保存可置于2-8℃。若溶液产生沉淀,应在使用前置于37℃下溶解沉淀。单独包装的RNase A在-20℃可稳定保存1年以上。加入RNase A后的溶液1应置于2-8℃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 μ g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。

- 按1:100的比例向溶液1中加入RNaseA,混匀,置于2-8℃保存。
- 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。
- 使用前请先检查溶液2和溶液3是否出现浑浊,如有混浊现象,可在37℃水浴中加热几分钟,即可恢复澄清。
- 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。
- 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 \times g)。
- 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
- 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。
- 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, 12,000rpm(\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 (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。

此步骤可能会影响质粒的得率, 如果宿主菌是 *endA*-宿主菌 (DH5a, 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。