

ATGPure[®] Plasmid Mini Kit

质粒少量提取试剂盒

D101

Version 23.1.1



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品组成	1
储存条件	1
注意事项	1
实验方案	2
常见问题	3

产品简介

柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒是巨匠生物最新研制成功的一种质粒小量抽提试剂盒。本产品采用了一种新型的吸附材料，新吸附柱具有良好的流速、超强的 DNA 结合能力和优秀的洗脱效率。改良的配方使试剂盒的菌液裂解能力、DNA 与吸附柱的结合能力大大加强，新型裂解染料 VisualDye 的加入让裂解过程变得可视、可控，实现质粒得率最大化。对于高拷贝质粒，从 6 ml 过夜菌液 (OD600=2.0) 中可以获得超过 35 μg 的质粒 DNA。操作过程快速、方便，无需使用酚/氯仿抽提，无需乙醇沉淀，整个抽提过程可以在 20 min 内完成。由本试剂盒抽提得到的质粒纯度高，OD260/OD280 比值一般为 1.8-1.9 之间，OD260/OD230 比值大于 2.0，可直接用于转化、DNA 测序、PCR、基于 PCR 的突变、体外转录、酶切等后续实验。

产品组成

组分	D101 (100 rxns)
纯化套件 (吸附柱+收集管)	100 套
Buffer S1	30 ml
Buffer S2	30 ml
Buffer S3	44 ml
Buffer DW	60 ml
Wash Solution	24 ml
Elution Buffer	10 ml
RNase A ^a	4.0 mg
VisualDye ^b	120 μl

a: RNase A 收到后，请及时存放于 2-8°C，长期贮存请于 -20°C 放置。

b: VisualDye 现用现加，不可提前预混至其他试剂组分中。

储存条件

试剂盒常温运输，未开启的试剂盒可以于室温 (15-25°C) 保存，有效期见包装。

加入 RNase A 后，Buffer S1 请存放于 2-8°C，有效期为半年。其他组分可于室温存放一年，长期存放请置于 2-8°C

注意事项

- ❖ Buffer S3 和 Buffer DW 中含有刺激性的化合物，操作过程中应穿上实验服，戴好乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，防止吸入口鼻。
- ❖ 沾染皮肤或眼睛后，请立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。

实验方案

自备材料：小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12,000 \times g$ ）、1.5 ml 离心管、无水乙醇等。

- ❖ 试剂盒初次开启，可用少量 Buffer S1 充分溶解 RNase A 粉末，再全部转移回 Buffer S1 瓶中，混匀后在瓶身做好标记。储存于 2-8℃，有效期为 6 个月。
- ❖ 按瓶身标签说明在 Wash Solution 中加入相应量的无水乙醇（乙醇终浓度为 80%），混匀后在瓶身做好标记。于室温密封保存。
- ❖ 每次使用前请检查 Buffer S2 和 Buffer S3 是否出现沉淀，如有沉淀，请于 37℃ 溶解沉淀，待冷却至室温后使用。

1. 在含合适抗生素的培养基中接种目标菌株，于 37℃ 摇床充分振荡培养 12-16 h。

- ❖ 菌液状态对质粒得率非常关键，请用不超过容器容量 1/4 体积的培养基进行培养。
- ❖ 处于生长平台期的菌体用于质粒抽提得率最高，过度培养可能导致 DNA 降解。

2. 对于高拷贝质粒，取 1.5-5 ml 菌液，于室温， $8,000 \times g$ 离心 2 min 收集菌体，倒尽或吸干培养基。

- ❖ 对于高拷贝质粒，从 5 ml 过夜菌液中通常可以获得超过 20 μg 质粒 DNA，不推荐使用更大的菌液量。
- ❖ 对于低拷贝质粒，如果使用更多的菌液，则同一个样品分多管收集，每管不超过 5 ml，分别裂解，合并同一个样品的各管裂解液通过同一个吸附柱来获得更高的得率。

3. 在菌体沉淀中加入 250 μl Buffer S1，吸打或振荡彻底悬浮菌体。

- ❖ Buffer S1 首次使用时请检查是否已加入 RNase A。
- ❖ 一定要彻底悬浮菌体，否则影响得率和质量。
- ❖ 如果使用 VisualDye，则在加入 250 μl S1 后再加入 1 μl VisualDye，振荡混匀。
- ❖ VisualDye 需在临用前加入，直接加入到 Buffer S1 中出现浑浊为正常现象。

4. 加入 250 μl Buffer S2，立即轻柔颠倒离心管 5-10 次混匀。

- ❖ 裂解时间与菌量相关，菌量多则适当延长时间，期间颠倒混匀几次，最长不能超过 5 min，请勿剧烈震荡！
- ❖ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法，计时从第一管样品加入开始。
- ❖ 如果使用了 VisualDye，则溶液呈现均匀的蓝色表示混匀良好，如果出现白色团块，则提示菌体可能过量，宜选用更少的菌液重新开始。

5. 加入 350 μl Buffer S3，立即轻柔颠倒离心管 5-10 次充分混匀。

- ❖ 如果同时操作多个样品，每加入一管混匀一管，不要采用全部加入一起混匀的方法。
- ❖ 加入 Buffer S3 后，离心管中会立即出现大量白色絮状沉淀，如果使用了 VisualDye，则溶液由蓝色重新变为无色，有蓝色残留提示混匀不彻底，继续混合至蓝色全部消失。
- ❖ 如果起始菌液较多，混匀后室温静置 2 min 以彻底去除 RNA。

6. 于离心机最大转速 ($\geq 12,000 \times g$) 离心 5-10 min, 将上清全部小心移入吸附柱, $9000 \times g$ 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

❖ 吸附柱的最大有效容积为 750 μ l, 如果裂解液较多, 可以重复该步骤直到至所有裂解液流过吸附柱。

7. (可选步骤) 在吸附柱中加入 500 μ l 去蛋白液 Buffer DW, $9000 \times g$ 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

❖ 对于 End A+宿主菌, 如 BL21, HB101, JM 系列等, 此步骤不能省略。

❖ 对于 End A-宿主菌, 如 DH5 α , TOP10 等, 此步可以省略, 但进行该步骤可进一步降低蛋白残留量。

8. 向吸附柱中加入 500 μ l Wash Solution, $9000 \times g$ 离心 30 sec。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。

❖ Wash Solution 首次使用前请检查是否已加入正确量的无水乙醇。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 将空吸附柱和收集管放入离心机, $9000 \times g$ 离心 1 min, 将吸附柱置于新的 1.5 ml 离心管中。

❖ 此步骤绝不可省略, 否则残余的乙醇会严重影响得率和后续实验。

❖ 离心后可将吸附柱与 1.5 ml 离心管整个装置开盖放于 50 $^{\circ}$ C 烘箱、超净台或通风橱中吹风 5 ~ 10 min, 以彻底去除残留的乙醇。

11. 在吸附膜中央加入 50-100 μ l Elution Buffer, 室温静置 1-2 min, $9000 \times g$ 离心 1 min。将所得到的质粒 DNA 溶液置于 -20 $^{\circ}$ C 保存或用于后续试验。

❖ Elution Buffer 为 2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 可以用 TE 或水 (pH > 7.0) 代替。

❖ 将 Elution Buffer 预热至 60 $^{\circ}$ C 可以进一步提高得率。

❖ 如果质粒 > 8 kb, 加入 Elution Buffer 后, 在 37-60 $^{\circ}$ C 温浴 2 min 可以显著提高得率。

❖ 使用小于 40 μ l 的洗脱液可以得到浓度更高的 DNA, 但得率显著降低。

常见问题

未提出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：由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低，可以使用更多的菌量但需要相应增加溶液使用量。
- C. 菌体中无质粒：有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如，柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定，因此不需要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。
- D. 碱裂解不充分：使用过多菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加 Buffer S1, S2 和 S3 的用量。
- E. 溶液使用不当：Buffer S2 和 S3 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37°C 温浴直至溶解，待冷却至室温后使用。
- F. 吸附柱过载：不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，请分多次提取。若用富集培养基 (如 SOC 或 SOB) 或宿主菌生长率较高，则须减少菌液用量。
- G. 质粒洗脱不完全：质粒洗脱时，可是当加温 (37-60°C) 或延长溶解时间，对大质粒效果更为明显。
- H. 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。
- I. 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。
- J. 洗脱液不合适：洗脱效率与洗脱液的 pH 值有关，如果使用水进行洗脱，请确保其 pH>7.0，如果 pH 过低可能导致洗脱量低，可以用 1 M NaOH 调节水的 pH 值。
- K. 洗脱体积太小：洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高，但质粒浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。
- L. 洗脱时间过短：洗脱时间对回收率也会有一定影响。洗脱时放置 1 min 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，并且对于大的质粒延长放置时间，让 DNA 完全溶解后再洗脱，可以提高洗脱效率。
- M. 溶液失效：Buffer S2 长期暴露在空气中容易失效，请每次使用完后，立即盖紧瓶盖，以免失效，造成碱裂解不充分。

2. 质粒纯度不高

- A. 混有蛋白：不要使用过多菌体。经 Buffer S1, S2 和 S3 处理，离心后溶液应为澄清的，如果还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到吸附柱中。

B. 混有 RNA: RNase A 处理不彻底, 请减少菌体用量或加入 Buffer S3 后室温再延长放置 5-10 min。如果 Buffer S1 已保存 6 个月以上, 请在 Buffer S1 中再添加终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 RNase A。

C. 混有基因组 DNA: 加入 Buffer S2 后应温和混匀, 如果剧烈振荡, 可能把基因组 DNA 打断从而混杂在质粒中。如果加入 Buffer S2 后过于粘稠, 无法温和混匀, 请减少菌体用量。细菌培养时间过长会导致细胞内 DNA 的降解, 培养时间不要超过 16 h。

D. 含大量核酸酶的宿主菌: BL21 和 HB101 等 End A+宿主菌含大量核酸酶, 在质粒提取和保存过程中可能导致质粒 DNA 降解, 影响提取质粒 DNA 的完整性, 对于这些宿主菌请在操作过程中使用去蛋白液 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. 如何选择最合适的洗脱体积

A. 质粒试剂盒具有优秀的洗脱效率, 通常情况下, 使用 50 μl 洗脱液进行洗脱, 回收率能达到 85%, 使用小于 40 μl 进行洗脱时, 质粒浓度提高, 但总得率下降明显, 而使用超过 100 μl 洗脱液进行洗脱, 质粒得率增加不多, 但浓度明显下降。通常来说, 如果预期质粒产量较低, 则使用更少的洗脱液以保证得到的质粒浓度不至于过低, 如果预期质粒产量较高, 则可以使用更多的洗脱液进行洗脱。



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室