



# 质粒小量提取试剂盒

## (Plasmid Miniprep Kit)

目录号: ZP101 版本: 2014-10-15

### 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
溶液 1	15 ml	30 ml	60ml
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	2X15 ml	2X30 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml	30ml
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,可稳定保存半年。

### 产品简介:

本试剂盒采用碱裂解法裂解细菌,再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的 DNA。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,如有混浊现象,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. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、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<sup>+</sup> (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：

- 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 (~13,400×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）。
- 重悬菌体：**向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μl 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。
- 裂解菌体：**向离心管中加入 250 μl 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，应当减少菌体量。
- 沉淀除杂：**向离心管中加入 350 μl 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 (~13,400×g) 离心 10 分钟，此时在离心管底部形成沉淀。将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱中（**吸附柱放入收集管中**），注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm (~13,400×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。  
**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。
- 可选步骤：**向吸附柱中加入 500 μl 去蛋白液 W1，12,000 rpm (~13,400×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<sup>+</sup> 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<sup>-</sup> 宿主菌（DH5α，TOP10 等），这步可省略。

- 向吸附柱中加入 700 μl 漂洗液 W2（**请检查是否已加入无水乙醇**），12,000 rpm (~13,400×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。
- 向吸附柱中加入 500 μl 漂洗液 W2，12,000 rpm (~13,400×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。
- 将吸附柱放入收集管中，12,000 rpm (~13,400×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。
- 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 60-100 μl 洗脱缓冲液 TE，室温放置 2 分钟，12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 分钟将质粒溶液收集到离心管中。  
**注意：**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 7.0-8.5 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 μl，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。