

FlaPure Mini Plasmid Kit

高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒

目录号

PE707-50

PE707-200

产品组成

组分	规格 (50 次)	规格 (200 次)
RNase A (100 mg/mL)	15 μ L	60 μ L
Buffer P1	15 mL	60 mL
Buffer P2	15 mL	60 mL
Buffer P3	20 mL	80 mL
Buffer W1	24 mL	75 mL
Elution Buffer	15 mL	25 mL
吸附柱 EC	50 套	200 套

保存条件

常温 (15~30°C) 干燥条件下保存 15 个月, 加入 RNase A 后的 Buffer P1 置于 2~8°C 保存。

产品简介

本试剂盒采用改良的 SDS-碱裂解法, 结合先进的硅胶膜吸附技术, 可达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适用于从 1~4 mL 的细菌培养物中提取多至 20 μ g 高纯度的质粒 DNA, 提取的质粒 DNA 可用于酶切、PCR、测序、细菌转化、体外转录与翻译等分子生物学实验。

产品特点

- ◇ 操作简便: 在 30 min 内可完成多个样品的质粒 DNA 提取;
- ◇ 高效: 可提取菌体 85% 以上的质粒 DNA。

适用范围

本品适用于从 1~4 mL 的细菌培养物中提取多至 20 μg 高纯度的质粒 DNA。

注意事项

1. Buffer P1 在使用前先加入 RNase A (试剂盒中提供的 RNase A 全部加入), 混匀后置于 2~8°C 保存;
2. 第一次使用前, 向 Buffer W1 中加入无水乙醇, 加入量参见瓶上标签;
3. 当环境温度低时, Buffer P2 中的 SDS 可能出现浑浊或析出沉淀, 将其 37°C 水浴加热几分钟即可恢复澄清, 请勿剧烈摇晃, 以免形成泡沫;
4. Buffer P3 中含刺激性溶液, 操作时要戴乳胶手套、口罩和眼镜。若沾染皮肤、眼睛应立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时及时就医;
5. 各溶液使用后请立即盖紧盖子;
6. 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、质粒的稳定性等因素有关。

使用方法

1. 取 1~4 mL 过夜培养的菌液, 12,000 $\times\text{g}$ 离心 1 min, 收集菌体, 尽量吸除上清;
2. 加入 250 μL Buffer P1 (请先检查是否已加入 RNase A) 重悬菌体沉淀 (若菌体沉淀未彻底悬浮会影响裂解效果, 导致提取得率和纯度偏低), 涡旋震荡至无菌块为止;
3. 加入 250 μL Buffer P2, 温和地上下翻转 6~8 次, 使菌体充分裂解;

注意: 此步需要温和翻转, 不能剧烈震荡, 以免打断基因组 DNA, 使提取的质粒中含有基因组 DNA 片段。混合后菌体应变得清亮粘稠, 若未变得清亮, 可能是由于菌体量过多, 裂解不充分导致, 应减少菌体量。

4. 加入 350 μL Buffer P3, 温和地上下翻转 6~8 次, 充分混匀 (此时会出现白色絮状沉淀), 12,000 $\times\text{g}$ 离心 10~15 min;
5. 小心吸取上清, 将上清转入吸附柱 EC 中 (注意不要吸出沉淀), 12,000 $\times\text{g}$ 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱 EC 放回空收集管;
6. 在吸附柱 EC 中加入 600 μL Buffer W1 (请先检查是否已加入指定体积的无水乙醇) 12,000 $\times\text{g}$ 离心 1 min, 弃废液;
7. 重复步骤 6;
8. 将吸附柱 EC 放回空收集管中, 12,000 $\times\text{g}$ 离心 2 min;
9. 取出吸附柱 EC, 放入干净的 1.5 mL 离心管中, 室温开盖静置 2 min, 使残留的乙醇挥发。在吸附膜的中间部位加入 35~50 μL Elution Buffer (60~65°C 预热 Elution Buffer 效果更好), 室

温静置 2 min, 12,000 ×g 离心 2 min。如需较多量 DNA, 可将得到的溶液重新转入吸附柱 EC 中, 离心 2 min。

注意: 洗脱体积越大, 洗脱得率越高, 如需得到较高浓度的 DNA, 可以适当减少洗脱体积, 但最小体积不应少于 25 μL, 体积过小会降低 DNA 洗脱得率, 降低产量。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序, 建议 ddH₂O 洗脱, 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; 且 DNA 产物应保存在-20°C, 以防 DNA 降解。

常见问题与解决办法

Q1: 质粒 DNA 产量低?

A1:

- 1) 质粒拷贝数低。载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2 ~3 倍的产量波动 (每毫升培养过夜的菌液, 高拷贝数的质粒载体产量为 3 - 16 μg)。长片段质粒和表达型载体常以中低拷贝数为主, 每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μg;
 - 低拷贝质粒: pBR322, pACYC 及其衍生载体, pSC101 及其衍生载体, SuperCos, pWE15;
 - 高拷贝质粒: pTZ, pUC, pBS, pGM-T。
- 2) 菌种问题。菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 培养细菌前最好先划线活化, 以稳定产量;
- 3) 细菌未充分裂解。细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬, 成团的细菌因无法裂解会降低产量;
- 4) 试剂准备有误。Buffer P2 若有沉淀析出需加热溶解, Buffer W1 加入乙醇体积不准确;
- 5) 洗脱效率低。将 Elution Buffer 预热至 60~65°C, 并进行二次洗脱。

Q2: 质粒 DNA 中有基因组 DNA 污染?

A2:

- 1) 菌液培养时间太长。菌液培养时间需控制在 12 ~16 h;
- 2) 裂解问题。加入 Buffer P2 时, 必须轻柔颠倒混匀; 处理多个样品时, 加入 Buffer P2 时算起, 总时间不要超过 5 min。