



ABIsoPure 质控型质粒小量提取试剂盒 (柱型)

适用范围: 适用于1-5mL小规模质粒制备

Cat. #: **AB3021(50preps)**
AB3022(100preps)

ABigen Corporation
www.abigen.com



❖ 适用范围:

适用于小规模质粒制备 (mini preparations)

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次	100 次
RNaseA (10mg/mL)	-20℃	125μL	250μL
溶液 P1(无色)	4℃	12.5 mL	25 mL
溶液 P2(蓝色)	室温	12.5 mL	25mL
溶液 P3(黄色)	室温	17.5 mL	35 mL
漂洗液 WB	室温	12mL 使用前按说明加指定量乙醇	20mL
洗脱缓冲液 EB	室温	10mL	15mL
吸附柱 CP3	室温	50 个	100 个
收集管 (2mL)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 第一次使用时, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100ug/mL) 置于 2-8℃ 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
2. 环境温度低时溶液 P2(蓝色)中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀, 可在 37℃ 水浴加热几 min, 即可恢复澄清, 不要剧烈摇晃, 以免形成过量的泡沫。

3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍：**

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，溶液中添加指示剂成分,可以观测裂解和中和情况,使反应更加完全,离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点：**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

❖ **注意事项**

1. 本试剂盒适用菌株为XL-1 Blue和DH5 α 等核酸酶含量低缺陷型菌株。所用菌株为JM系列、HB101等endA菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应购买本公司生产的高纯度质粒小量快速提取试剂盒。
2. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到12,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415D 或者类似离心机。
3. 溶液P3中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。

4. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒, 建议**接种单菌落于1-5 mL加合适抗生素的LB培养基, 过夜培养14-16个小时**, 可提取出多达20 μ g的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10kb的大质粒, 应适当加大菌体使用量, 使用5-10 mL过夜培养物, 同时按比例增加P1、P2、P3的用量, 其它步骤相同。
5. 得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD₂₆₀值为1相当于大约50 μ g/mL DNA。**电泳可能为单一条带, 也可能为2条或者多条DNA条带**, 这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成, 与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%。**
6. **质粒DNA确切分子大小, 必须酶切线性化后**, 对比DNA分子量Marker才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒, 泳动位置不确定, 无法通过电泳知道其确切大小。
7. **洗脱液EB不含有螯合剂EDTA**, 不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗脱, 但应该确保pH大于7.5**, pH过低影响洗脱效率。用水洗脱质粒应该保存在-20 $^{\circ}$ C。质粒DNA如果需要长期保存, 可以用TE缓冲液洗脱(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), 但是EDTA可能影响下游酶切反应, 使用时可以适当稀释。

❖ **操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)**

提示:

- ⇨ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇, 充分混匀, 加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇, 以免多次加

入!

⇒将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃ 保存。

1. 取 1-5 mL 过夜培养的菌液，放入离心管,12,000rpm 离心 1min, 尽可能的倒干上清，收集菌体。
收集超过 1.5 mL 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5mL 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
2. 用 250μL 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。
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。
3. 向离心管中加入 250μL 溶液 P2(蓝色)，温和地上下翻转 5 -10 次使菌体充分裂解，室温放置 1-5min。
温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5min！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠淡蓝色，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5min。
4. 向离心管中加入 350μL 溶液 P3(黄色)，立即温和地上下翻转 5 -10 次，充分混匀时会出现浅黄色絮状沉淀。12,000rpm 离心 10min，小心取上清。
加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀,蓝色部分应该完全变成黄色,表明中和完全。如果上清中还有微小浅黄色沉淀，可再次离心后取上清。
5. 将上一步所得上清加入吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中），12,000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液。

6. 加入 500 μ L 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 1min, 弃掉废液。
7. 再次加入 500 μ L 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 1min, 弃掉废液。
8. 将吸附柱 CP3 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 取出吸附柱 CP3, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 50-100 μ L 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2min, 12,000rpm 离心 1min。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1min。

洗脱体积越大, 洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小体积不应少于 30 μ L, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
质粒 DNA 产量低	*忘加抗生素，非质粒转化细胞过度生长- 建议 ：确保固体、液体培养基中都加入了适当的抗生素。
	*细菌培养时间太长，老化细菌开始裂解- 建议 ：接种过夜培养的新鲜单菌落于加了合适抗生素的培养基中，培养 12-16 个小时。
	*使用了低拷贝数质粒- 建议 ：使用高拷贝数质粒，低拷贝数质粒应该适当加大处理体积。
	*细菌培养时间过短，细菌浓度过低- 建议 ：细菌培养到[A ₆₀₀]吸光值为 2-4 时，收集菌体。
	*细菌细胞裂解不完全- 建议 ：使用建议的菌体处理量，不要过量；涡旋或者吹打，确保菌体充分重悬于溶液 P1 中，不应该见到未散开的细菌团块；加入裂解液 P2 后，应该是粘稠和透明的。
	*质粒 DNA 产量使用分光光度计定量不准确- 建议 ：分光光度计定量常常偏高，使用琼脂糖电泳/EB 染色定量。
	*洗脱效率不高- 建议 ：请阅读操作步骤 8 和注意事项 6。
质粒 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*忘记做步骤 8，乙醇抑制了酶切反应- 建议 ：做步骤 8，然后空气中晾 5min，让残留乙醇挥发。 *一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应- 建议 ：将洗脱的回收 DNA 溶液 12,000rpm 再

离心 1min，小心取上清使用。

质粒 DNA 降解
或者无质粒
DNA

*核酸酶活性太高-建议：请选用本公司的高纯度质粒提取试剂盒(附带去核酸酶的去蛋白液 PE)

产物中含有
RNA 污染

*第一次做实验时,忘记将 RNase A 加入 P1 溶液, RNase A 失活或者起始处理量过量-**建议**：第一次实验前确保将 RNase A 加入了溶液 P1; P1 溶液超过 3 个月的,可加入一些新 RNase A; 处理量不要过量; 菌体重悬于 P1 溶液后可放置几 min 让 RNase A 充分作用后再进行下一步。
