

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 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
4. 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。
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 ($\sim 13,400\times g$)。
6. 提取的质粒量与细菌培养浓度、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⁺ (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:

1. 柱平衡处理: 向吸附柱中加入250 μl 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 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。

4. 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，应适当减少菌体量。

5. 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 ($\sim 13,400\times g$) 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, 以增加提取效率。其它步骤相同。

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 $^{\circ}$ C) 干燥条件下, 可保存 2 年; 更长时间的保存可置于 2-8 $^{\circ}$ C。若溶液产生沉淀, 应在使用前置于 37 $^{\circ}$ C 下溶解沉淀。单独包装的 RNaseA 在 -20 $^{\circ}$ C 可稳定保存 2 年以上。加入 RNase A 后的溶液 K1, 可室温稳定保存半年以上 (2025 年优化产品配方)。