

# ABHipure高纯度质粒小量提取试剂盒 (柱型)

适用范围: 适用于小规模质粒制备 (mini preparations)

Cat. #: **AB3011(50preps)**  
**AB3012(100preps)**



## ABHipur高纯度质粒小量提取试剂盒(柱型)

### ❖ 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	4℃	12.5 mL	25 mL
溶液 P2	室温	12.5 mL	25mL
溶液 P3	室温	17.5 mL	35 mL
去蛋白液 PE	室温	30mL	60mL
漂洗液 WB	室温	12 mL 第一次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 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀, 可在 37℃ 水浴加热几分钟, 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，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，再通过去蛋白液和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采用特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 独有的去蛋白液配方，可以高效去除残留的核酸酶，即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除。有效防止了质粒被核酸酶降解。
3. 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80%以上菌株如：XL-1 Blue和DH5 α 等核酸酶含量低缺陷型菌株。**JM系列、HB101等endA菌株或野生型菌株，均可提取**，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。
2. 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。

3. 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 $\mu$ 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。
4. 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。OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50 $\mu$ 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。**本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%**。
5. **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。
6. **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 250 $\mu$ L 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 250 $\mu$ L 溶液 P2，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 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确到 5 分钟。**
4. 向离心管中加入 350 $\mu$ L 溶液 P3，立即温和地上下翻转 5-10 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。12,000rpm 离心 10min。  
**加入溶液 P3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。**
5. 将上一步所得上清加入到吸附柱 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. **可选步骤**:加入 500 $\mu$ l 去蛋白液 PE，12,000rpm 离心 30-60 秒，

弃废液。

此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5 $\alpha$  等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

7. 向吸附柱 CP3 中加入 500 $\mu$ 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。
8. 重复操作步骤 7。
9. 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。
10. 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 $\mu$ L 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液 EB 可事先在 65 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好），室温放置 2min，12,000rpm 离心 2min。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，再次离心 2min。

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 $\mu$ 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- <b>建议</b> ：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<sub>600</sub>]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 9,10 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 9，乙醇抑制了酶切反应-**建议**：做步骤 9，然后空气中晾几分钟，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 1 分钟，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 溶液后可放置几分钟让 RNase A 充分作用后再进行下一步。

---