



硅胶膜型质粒 DNA 小量提取试剂盒

操作方法

1. 将 3~5ml 菌液 13,000rpm 离心 30 秒收集沉淀（菌体）。如果用 1.5ml 或 2ml 离心管则需反复离心 2~3 次。
2. 倒掉上清，将沉淀（菌体）完全悬浮于 100 μ l 悬浮液（溶液 I）中。上清要尽可能去除干净，可用滤纸吸干。沉淀要用混旋器完全悬浮，否则将直接导致下一步的裂解不彻底，进而影响质粒 DNA 的产量和纯度。
3. 加入 150 μ l 裂解液（溶液 II），轻柔地颠倒混匀 10 次左右，溶液逐渐变得粘稠、清亮。不可用混旋器剧烈振荡，否则会使质粒 DNA 断裂；裂解时间不宜超过 5 分钟，否则会造成染色体 DNA 的污染。
4. 加入 150 μ l 中和液（溶液 III），轻柔地颠倒混匀 10 次左右。此时可见到白色絮状的染色体 DNA 及细菌碎片。
5. 13,000rpm 离心 8~10 分钟，将上清液小心转移入一个新的 1.5ml 离心管中，加入等体积（约 400 μ l）的结合液，颠倒混匀。
6. 将混和液吸入离心纯化柱中，静置至少 3 分钟，13,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。此步使处于高盐状态下的质粒 DNA 与硅胶膜结合后，离心去除杂质。
7. 将离心纯化柱重新套入废液收集管中，加入 600 μ l 80% 异丙醇（或 80% 乙醇），13,000rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。如果离心纯化柱底部残留有异丙醇（或乙醇），可用滤纸吸干，否则将影响以后的酶促反应。此步是洗涤质粒 DNA 中混有的杂质及盐类。
8. 重复第 7 步一次，尽可能将杂质及残留的乙醇去除。
9. 取出离心纯化柱，将其套入一个干净的 1.5ml 离心管，开盖放置 2~3 分钟，使乙醇充分挥发干净。加入 50 μ l TE 缓冲液（若用于测序，则加 50 μ l 超纯水）于硅胶膜上，不能粘在管壁上。室温下放置 5 分钟后，13,000rpm 离心 1 分钟。离心柱放入离心管中，若盖不上盖子，亦没有关系，可开盖离心。TE 缓冲液或无菌超纯水的用量视用户对浓度的要求而定。
10. 将洗脱液重新吸入离心纯化柱中，再洗脱一次。这样可以获得较高产量的质粒 DNA。
11. 离心管中收集的液体即是洗脱下来的质粒 DNA，取 1~2 μ l 电泳（0.8% 琼脂糖，120V，15~20 分钟）检测其纯度并目测量。若发现有 RNA 污染，可加入 0.5 μ l RNase A（10mg/ml），37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。此操作不影响其后续实验。



补充说明

如果起始菌液体积较大或收集的菌体较多，溶液 I、II、III 的用量及其它试剂可相应放大。但操作略有不同，需要时我们乐于提供帮助。

实验证明，少量的RNA 污染对于酶切、转化及测序无明显的影响。

常见问题及参考意见

常见问题	可能原因	参考意见
质粒产量低	细胞裂解不充分	减少培养物体积。对于高拷贝质粒，培养物体积不要超过 5ml，低拷贝质粒培养物体积不要超过 10ml
		按比例增加溶液 I 与溶液 II 的体积，使菌体充分悬浮，然后完全裂解细胞
	非转化细胞的大量生长	必须在选择条件下扩增质粒 DNA
	定量不准确	通过琼脂糖凝胶电泳进行观察及定量
	不合适的保存条件	将质粒 DNA 溶于无菌超纯水或 TE 中，于 -20℃ 保存
	菌液培养的时间过长	在新鲜的选择平板上挑选一个分隔良好的单菌落，于 37℃ 振荡培养 12~16 小时
	质粒的拷贝数太低	增加培养物体积，但不要超过 10ml
	溶液 II 及结合液有结晶出现	将溶液 II 及结合液置于 37℃ 温浴 30min 以上，使结晶完全溶解，且在使用前要充分混匀
	洗脱温度过低	加入无菌超纯水或者 TE 浸透硅胶膜后，于 37~50℃ 温浴 2 分钟
	洗脱液 pH<7.0	用 TE 或 pH>7.0 的无菌超纯水洗脱
洗脱液中没有质粒DNA	质粒DNA 漂出点样孔	增加甘油或蔗糖助沉
	质粒丢失	在新鲜的选择平板上挑选生长良好的单克隆进行细菌培养
		对质粒 DNA 进行重新转化
杂菌污染	在选择平板上挑选生长正常的菌落进行摇菌	
电泳时质粒呈现额外条带	开环质粒DNA 及线状质粒 DNA 的存在	加入裂解液后，轻轻混匀，时间不要超过 5min
	可能存在缺失突变体	有些质粒如 cosmids 长期保存于 E.coli 中是不稳定的，在摇菌时应在选择平板上挑选新鲜的，分隔良好的单克隆



电泳时质粒呈现额外条带	存在质粒多聚体	单酶切后，质粒多聚体酶切为线状质粒DNA，可与染色体 DNA 的污染相区别
	存在变性的超螺旋质粒 DNA	加入裂解液（溶液 II）后，碱裂解时间不要超过 5 分钟
RNA 污染	菌体过量，导致 RNase A 相对量不足	减少培养菌液的体积
	溶液 I 放置时间超过 6 个月	于 100 μ l 溶液 I 中加入 1 μ l RNase A（10mg/ml）或于洗脱液中加入 0.5 μ l RNase A，37 $^{\circ}$ C 温浴 30min 以上
染色体污染	混合操作过于剧烈	加入溶液 II、溶液 III 之后，轻柔地颠倒混匀，不要剧烈振荡
	裂解时间过长	裂解时间不要超过 5 分钟
	细菌培养期间，出现细胞裂解	菌液的培养时间不要超过 12~16 小时
质粒 DNA 降解	核酸酶的存在	更换菌株，有些菌株，例如 HB101、TG1、JM100 等含有高水平的核酸内切酶活性
		使用灭菌的玻璃及塑料制品
		用无菌超纯水或 TE 洗脱质粒 DNA
质粒 DNA 在下游操作过程中出现问题	盐的浓度过高	用 80%乙醇漂洗质粒 DNA
		增加漂洗次数
	缺口质粒 DNA 的存在	减少菌液培养的体积
		更换菌株，情况可能会变好
	蛋白质未去除干净	检查菌液体积、培养基、菌株生长状况等
增加漂洗液的体积及漂洗次数		
残留有有机试剂	增加离心时间，将 80%乙醇或异丙醇去除干净	

北京赛百盛基因技术有限公司

全国统一热线：400 666 3029

地址：北京市海淀区上地四街 1 号院 2 号楼 202 室 邮编：100085

电话：010-62969345/46，010-82784296/92 传真：010-82784290

Email: info@sbsbio.com

<http://www.sbsbio.com>