

## 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 100μl 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 150μl 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 150μl 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 400μl）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 600μl 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 50μl TE 缓冲液（若用于测序，则加 50μl 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 $\mu$ l 电泳（0.8%琼脂糖，120V，15~20 分钟）检测其纯度并目测定量。

若发现有 RNA 污染，可加入 0.5 $\mu$ l RNase A (10mg/ml)，37℃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 <b>cosmids</b> 长期保存于 <b>E.coli</b> 中是不稳定的, 在摇菌时应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 $\mu$ l 溶液 I 中加入 1 $\mu$ l RNase A (10mg/ml) 或于洗脱液中加入 0.5 $\mu$ 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