

## 操作说明

Version: HBRG-PPMED-001

### 产品信息

产品名称	PlasPure™ 质粒中量制备试剂盒
货号	HB-PPMED-50
存储及运输条件	室温或置于 2 ~ 8 °C 储存，常温运输
规格	50T
有效期	溶液部分 18 个月

### 产品组成

组成	HB-PPMED-50
Plasmid Recovery Column	50 个
2 mL Collection Tube	50 个
Buffer CBS*	15 mL
Solution I	30 mL
Solution II	30 mL
Solution III	42 mL
W1 solution	30 mL
Wash Solution*	12 mL

Elution Buffer	10 mL
RNase A (10 mg/mL)	240 $\mu$ L

## 实验前小贴士

- 1、第一次使用产品前，请仔细阅读该说明书。
- 2、确认 Solution I 中已经加入 RNase A，并做好标记。独立包装的 RNase A 收货后请于-20°C 保存，室温(25°C)可稳定保存一个月以上；初次使用本试剂盒时，请将 RNase A 全部加入 Solution I 中，均匀混合后，4°C保存，标明日期，如长时间不用，请于-20°C冻存。
- 3、实验前检查 W1 solution 和 Washing Solution 是否按照要求加入乙醇，使用后及时盖紧瓶盖，防止乙醇挥发。
- 4、Solution II、Solution III可室温保存。实验前 4°C预冷 Solution III可达到更好的实验效果。
- 5、室温较低时，请检测 Solution II 中是否有沉淀。若有沉淀，37°C保温溶解，待恢复到室温后使用。
- 6、准备好过夜培养且状态良好的菌液。
- 7、Buffer CBS 用于质粒提取前柱子的平衡处理，可以活化硅胶膜，有利于提高质粒的产量。
- 8、试剂盒其余组分于室温（15°C~25°C）可稳定存放 1.5 年而使用活性无明显衰减。室温过高或需要更长期保存，请放置于 2~8°C。
- 9、本产品正常情况常温运输。如果温度高于 30°C，请酌情放置冰袋。

## 产品简介

吸附柱容量：~70  $\mu$ g。

本试剂盒采用常规碱裂解法分离质粒 DNA，并结合膜吸附技术特异性吸附质粒 DNA，具有高效、快速、方便的特点。

## 使用方法

1. DNA 吸附柱平衡处理：向吸附柱中加入 200 $\mu$ L buffer CBS，12,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回到收集管中备用。

注意：请使用当天处理过的 DNA 吸附柱。

2. 取 4~6 mL 2YT 或 LB 培养基过夜培养的菌液，8000 rpm 离心 1 min，弃尽上清。

注意：4~6 mL 菌液分 2~3 次离心至 2 mL 离心管中。

对于较低拷贝数的质粒，请用 10 mL 菌液，并按比例增加 Solution I, II 和 III 的用量，或分多

个离心管处理，最后通过多次离心将上清液收集到一个吸附柱中。

3. 加入 500 $\mu$ L Solution I，用枪头或振荡器充分悬浮细菌。

**注意：不要残留细小菌块，否则会影响裂解，导致提取质粒量低和质量下降。**

4. 加入 500 $\mu$ L Solution II，立即温和并充分地上下翻转混合 4 ~ 6 次，使菌体充分裂解，直至形成透亮的蛋清状溶液，此步骤不宜超过 5 min。

5. 加入 700 $\mu$ L Solution III，温和并充分地上下翻转混合 8 ~ 10 次(混匀的状态应为白色)，室温放置 2 ~ 5 min。12,000 rpm，离心 5 ~ 10 min。

6. 将步骤 5 中的上清液分两次转移到套放于 2 mL 收集管内的 Plasmid Recovery Column 中，室温 6000 rpm 离心 1 min，取出 Plasmid Recovery Column，倒掉收集管中废液。

7. 将 DNA 吸附柱重新放回收集管中，加入 500 $\mu$ L W1 Solution，12,000 rpm，室温离心 1 min，倒掉收集管中废液。

8. 将 Plasmid Recovery Column 重新放回收集管中，加入 500 $\mu$ L Wash Solution，12,000 rpm，室温离心 1 min，倒掉收集管中废液。

9. 重复步骤 8 一次。

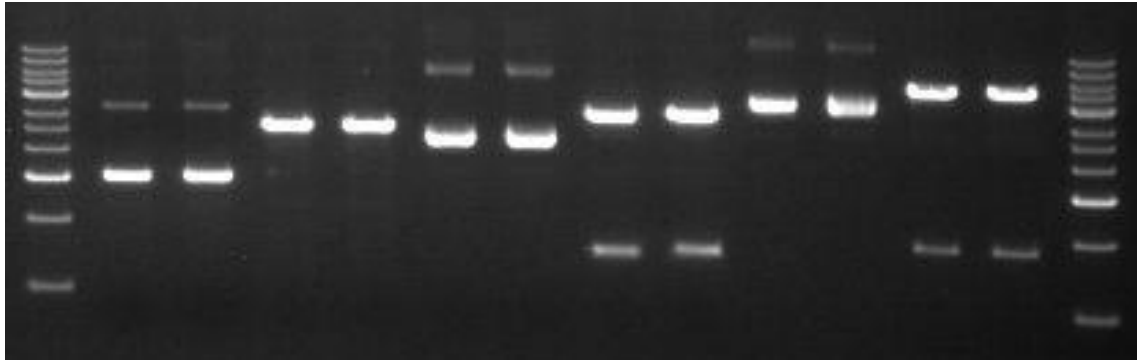
10. 倒掉收集管中废液，12,000 rpm，室温离心 1 min，彻底去除 Wash Solution（此步骤不可省略）。然后开盖室温放置数分钟，以彻底晾干吸附柱中残留的漂洗液。

11. 将 Plasmid Recovery Column 放入干净的 1.5 mL 离心管中，在 Plasmid Recovery Column 膜中央加入 100 $\mu$ L Elution Buffer，37 °C 放置 2 min。

12. 12,000 rpm，室温离心 1 min，离心管中的液体即为包含目的质粒的溶液。

13. 取 1 ~ 3  $\mu$ L（视质粒浓度而定）进行琼脂糖凝胶电泳检测，纯化好的 DNA 可立即用于后续实验或 -20 °C 冻存。

## 附件 1: 结果实例



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

上图中显示三种原始质粒及酶切效果。(每种质粒平行做两份)

泳道 1,2: 为原始质粒(pUC19 载体)

泳道 3,4: 为其 EcoRI 单酶切效果

泳道 5,6: 为 pUC19 衍生质粒 (4 kbp)

泳道 7,8: 为其 EcoRI/Hind III 双酶切效果

泳道 9,10: 为 pCDNA3.1 衍生质粒 (6 kbp)

泳道 11,12: 为其 Bgl II/BamH I 双酶切效果

M: DNA Marker DL10001(500 bp~12 kb)

## 附件 2：常见问题分析

### 1. 纯化质粒 DNA 时，一般使用多少菌体培养液比较合适？

根据我们的经验，高产培养基，如 2xYT，4~6 mL 菌液即可，常规培养基，如 LB 培养基，5~10 mL。菌液生长不好时可适当增加菌液。菌液不可过量，否则会导致溶液不足，严重影响提取质粒的质量。我们一般使用 4 mL 2xYT 培养基的菌体培养液进行质粒 DNA 提取即可得到理想的实验结果。

### 2. 本试剂盒对较低拷贝质粒的纯化提取情况如何？

本试剂盒主要用于提取较大量的质粒，优化了 DNA 吸附柱，不建议用于提取较低拷贝数的质粒。使用较多的菌液时，需要按比例增加相应溶液的量，然后将上清分多次吸附到同一根柱子上，这样可以增加最终提取质粒的量。

### 3. 为什么质粒 DNA 的收量较低？

一般情况下，从 4 mL 的 LB 培养基进行过夜培养的 pUC18/DH5alpha 培养液中，可以纯化得到约 30~50 $\mu$ g 的高纯度质粒 DNA。质粒 DNA 产量较低时，可以从以下几个方面考虑：

- (1) 大肠杆菌太陈旧。请重新转化或涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。
- (2) 质粒拷贝数低。使用低拷贝数载体时，每次提取的质粒 DNA 量较低，应适当加大菌液量。
- (3) 所用抗生素浓度低或部分失效，导致大量不含质粒的菌体也可生长。
- (4) 检查各试剂及适当设计相应实验检查问题。应严格按操作方法进行操作。
- (5) 洗脱液体积太小或太大，最小应加入 50 $\mu$ L Elution buffer，体积太小，吸附膜浸润不充分。

### 4. 为什么加入 Solution II 后的溶菌液不澄清？

- (1) 菌体量过多，不能充分溶菌。使用本试剂盒时，每次可处理的菌体培养液为 4~6 mL，较多的菌液请分两管处理。
- (2) 菌体沉淀悬浮不充分。在加入 Solution I 后，应使用振荡器 (Vortex) 等进行剧烈振荡使菌体沉淀充分悬浮后再做溶菌处理。
- (3) 有杂菌污染，外源污染的菌体不能被裂解。

### 5. 产物中有 RNA 污染？

- (1) 第一次实验时忘记将 RNase A 加入到 Solution I 中，请检查确保 Solution I 中已经加入 RNase A。
- (2) 加入 RNase A 的 Solution 放置时间太久 (如大于 3 个月)，请适当补加一些新 RNase A。
- (3) 处理的菌体量过多，请减少起始的菌量或适当增加相应溶液。

### 6. 为什么质粒 DNA 测序结果不佳？

- (1) 模板 DNA 定量不准。请对质粒 DNA 正确定量。使用吸光度值定量时，有时 DNA 溶液中

的不纯物会影响吸光度值的测定，此时建议使用琼脂糖凝胶电泳法进行定量。

(2) 质粒 DNA 纯度不好。请严格遵守实验操作要求，使用新鲜菌体培养液提取质粒。

(3) DNA 插入片段本身立体结构复杂。有些 DNA 二级结构复杂（如 GC rich、重复序列，回文结构等）时难以测序，应改进测序方法。