

Code No. 9760

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Plasmid
Purification Kit Ver.4.0

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 使用前的准备事项	1
● 操作方法	2
● 使用例	3
● 注意事项	3
● Q&A	3

● 制品说明

本试剂盒是用于质粒 (Plasmid) DNA 小量纯化的试剂盒。试剂盒采用了传统的 SDS 碱裂解法, 结合硅胶膜技术, 具有高效、快速、方便之特点, 全套操作只需 1 小时便可完成。使用本试剂盒可从 1~4 ml LB 培养基过夜培养的菌液中纯化得到 1~20 μg 的高纯度质粒 DNA ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8\sim 2.0$), 制备过程无需苯酚抽提、乙醇沉淀等步骤, 所得质粒 DNA 溶解于 Tris Buffer 或水中, 纯度较高, 可直接用于转化、DNA 序列分析、体外转录、限制酶切以及其他各种酶促反应。

● 制品内容 (50 次量)

本试剂盒分试剂 Set 与 Column Set 两部分。

■ 试剂 Set

RNase A (10 mg/ml)	140 μl
Solution I	14 ml
Solution II *1	14 ml
Solution III *2	24 ml
Buffer WA *2	28 ml
Buffer WB *3	24 ml
Elution Buffer	2 ml \times 2

*1 含有强碱溶液, 应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时, 请立即到医院进行处理。

*2 含有强变性剂, 应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时, 请立即到医院进行处理。

*3 首次使用前, 向 Buffer WB 中添加 56 ml 的 100%乙醇。

■ Column Set

Spin Columns	50 支
Collection tubes	50 支

【试剂盒之外所需准备试剂】

◆ 无水乙醇

◆ 灭菌水或 Tris-HCl (pH8.0)

● 保存与运输

1. 本试剂盒可以在室温下 (15~25 $^{\circ}\text{C}$) 保存, 但温度较低时, 有的 Buffer 会出现沉淀, 使用前需 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热直至沉淀消失。
2. Solution I 中加入 RNase A 后可于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存约 3 个月。
3. RNase A 可于室温下 (15~25 $^{\circ}\text{C}$) 保存 6 个月, 长期保存需存放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。
4. 本试剂盒于室温下 (15~25 $^{\circ}\text{C}$) 运输。

● 使用前的准备事项

1. 初次使用本试剂盒时, 请将 RNase A 混浊液全部加入到 Solution I 中, 均匀混合后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
2. 首次使用前, 向 Buffer WB 中添加 56 ml 的 100%乙醇。
3. 检查 Solution II 和 Solution III 中是否有沉淀, 如果有沉淀请将试剂置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴直至沉淀全部消失, 不可剧烈振荡 Solution II, 以免产生大量气泡。

4. Solution II 使用后, 应立即盖紧盖子, 避免试剂长时间与空气接触。
5. Solution III 使用前请于 4°C 预冷。
6. 试剂中含有强碱及变性剂, 操作时应佩戴手套等防护用具。

● 操作方法

确认 Solution I 中是否加入了 RNase A; Buffer WB 中是否加入了无水乙醇。

实验操作前请将 Solution III 置于 4°C (或冰上) 预冷后使用。
操作流程见图 1, 全套操作约需 1 小时, 详细说明如下。

1. 大肠杆菌的培养。
从平板培养基上挑选单菌落接种至 1~4 ml 的含有抗生素的液体培养基中, 37°C 过夜培养 (培养 12~16 小时, 培养超过 16 小时细胞将难以裂解, 质粒收量也会随之降低)。
注) 培养液不宜过量, 培养液过量时, 会因菌量太大而溶菌不充分, 纯化时会影响质粒的纯度。
2. 取 1~4 ml 的过夜培养菌液, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 弃上清。
3. 用 250 μl 的 Solution I (含 RNase A) 充分悬浮细菌沉淀。
注) 注意不要残留细小菌块, 可以使用振荡器 (Vortex) 等剧烈振荡使菌体充分悬浮。
4. 加入 250 μl 的 Solution II 轻轻上下翻转混合 5~6 次, 使菌体充分裂解, 形成透明溶液。
注) 轻轻颠倒混合, 不可剧烈振荡, 此步骤不宜超过 5 分钟。
5. 加入 350 μl 的 4°C 预冷的 Solution III, 轻轻上下翻转混合 5~6 次, 直至形成紧实凝集块, 然后室温静置 2 分钟。
6. 室温 12,000 rpm 离心 10 分钟, 取上清。
注) 此时 4°C 离心不利于沉淀沉降。
7. 将试剂盒中的 Spin Column 安置于 Collection Tube 上。
8. 将操作步骤 6 的上清液转移至 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
9. 将 500 μl 的 Buffer WA 加入 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 30 秒钟, 弃滤液。
10. 将 700 μl 的 Buffer WB 加入 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 30 秒钟, 弃滤液。
注) 请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100% 乙醇。
11. 重复操作步骤 10。
12. 重新将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 除尽残留洗液。
13. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 50 μl 的灭菌水或 Elution Buffer, 室温静置 1 分钟。
注) 将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 60°C 使用时有利于提高洗脱效率。
14. 12,000 rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA。

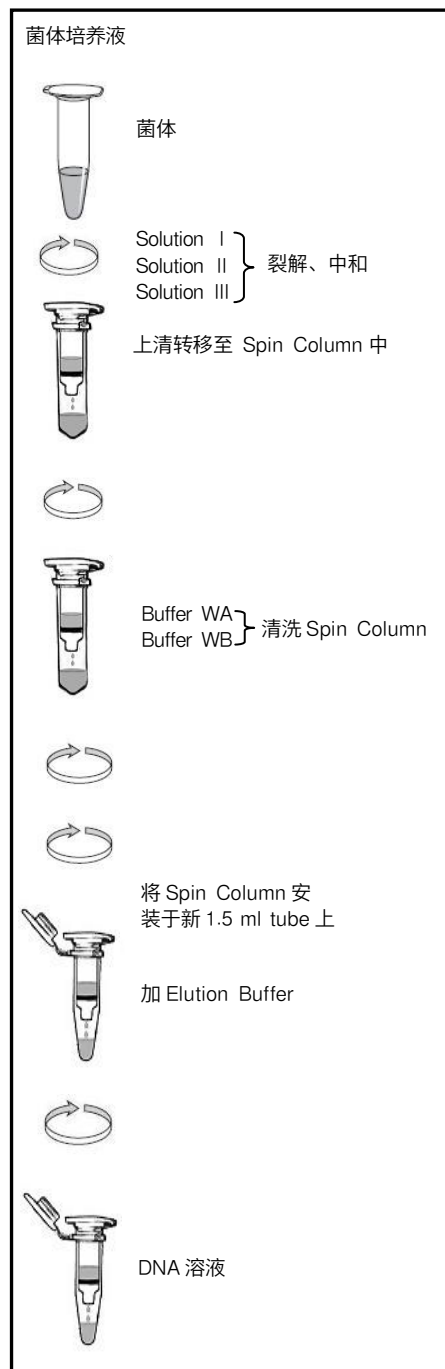


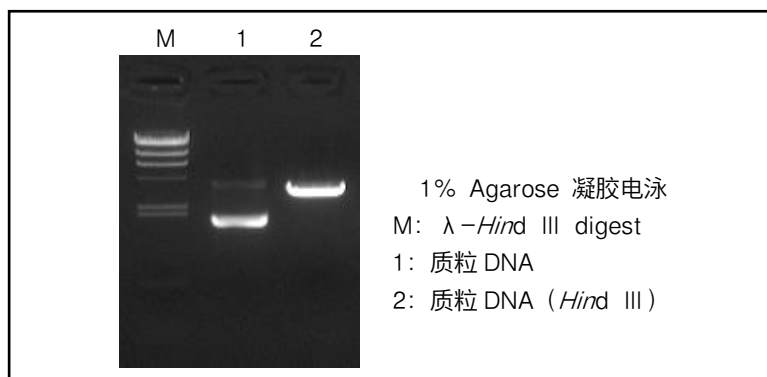
图 1. 操作流程简图

如果实验室备有适合于 Spin Column 接口的负压装置，可从上述操作步骤 6 以后进行以下操作。

7. 将试剂盒中的 Spin Column 插到负压装置的插口上。
8. 将上述操作步骤 6 的上清液转移到 Spin Column 中，开启调节负压装置，缓慢吸走 Spin Column 中的溶液（流速控制在 1 滴/秒）。
9. 将负压调至最大，向 Spin Column 中加入 500 μ l 的 Buffer WA，吸尽 Spin Column 中溶液。
10. 向 Spin Column 中加入 700 μ l 的 Buffer WB，吸尽 Spin Column 中溶液。
注) 请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。
11. 重复操作步骤 10，然后从负压装置上取下 Spin Column，将其安置于 Collection Tube 上。
12. 12,000 rpm 离心 1 分钟，除尽残留洗液。
13. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上，在 Spin Column 膜的中央处加入 50 μ l 的灭菌水或 Elution Buffer，室温静置 1 分钟。
注) 将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 60 $^{\circ}$ C 使用时有利于提高洗脱效率。
14. 12,000 rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA。

● 使用例

使用本试剂盒纯化 1.5 ml 的 TB 培养基的菌液（菌体 JM109），得到约 16 μ g 的质粒 DNA（OD₂₆₀/OD₂₈₀ \geq 1.8），此质粒为 pUC119，用 *Hind* III 酶切 1 小时（电泳结果见图 2）。



● 注意事项

1. 每次起始的菌液量应控制在 1~4 ml，菌量太大影响溶菌及质粒 DNA 的释放，纯化时会影响质粒 DNA 的纯度。菌体的培养时间不要超过 16 小时，否则难以裂解。
2. 加入 Solution II 和 Solution III 后，不要剧烈混合（Vortex 等），剧烈混合会导致基因组 DNA 的污染。
3. 加入 Solution III 后，应充分混合使蛋白质、基因组 DNA 等形成白色沉淀，离心后沉降于离心管底部。若离心后沉淀仍悬浮于溶液中时，请将离心管上下翻转混合数次后高速离心 3~5 分钟。
4. 纯化的质粒 DNA 用于 DNA 序列分析时，最好使用灭菌水洗脱质粒 DNA。
5. 质粒 DNA 需长期保存时，建议在 Elution Buffer 中保存。

● Q&A

Q1. 纯化质粒 DNA 时，一般使用多少菌体培养液比较合适？

A1. 根据我们的经验，如为高拷贝质粒（如：pUC118 等），使用 2ml 培养液与 4ml 培养液纯化的质粒 DNA 的收量差别不是很大，可以纯化 10~15 μ g 高纯度质粒 DNA。我们一般使用 2 ml 的菌体培养液进行质粒 DNA 提取。

- Q2. 本试剂盒对低拷贝质粒的纯化提取情况如何?
- A2. 对于低拷贝质粒, 使用 4 ml 的菌体培养液进行质粒 DNA 的提取比较合适。如使用 pBI121 质粒时, 从 4 ml 的菌体培养液中, 可以纯化提取 2~3 μg 的高纯度质粒 DNA。若质粒质量仍不够可以多次提取后混合使用。
- Q3. 质粒 DNA 的收量较低, 为什么?
- A3. 一般情况下, 从 2 ml 的 LB 培养基进行过夜培养的 pUC118/JM109 培养液中, 可以纯化约 10 μg 高纯度质粒 DNA。质粒 DNA 收量较低时, 可以从以下几个方面考虑:
- ① 大肠杆菌太陈旧 (低温下长期保存的菌等)。请涂布平板培养后, 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, 每次产出的质粒 DNA 量会降低。
 - ③ 确认操作过程的严密性。应严格按操作方法进行操作。
 - ④ 洗脱时将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 60°C 后使用有利于提高洗脱效率。
- Q4. 加入 Solution II 后的溶菌液不澄清, 为什么?
- A4. 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 1~4 ml, 菌体量过多时, 需要按照比例增加 Solution I/II/III 的加量。
- 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。
- Q5. 质粒 DNA 测序结果不佳, 为什么?
- A5. ① 模板 DNA 加量不准。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 进行 DNA 洗脱时用灭菌水洗脱。
- ④ DNA 插入片段本身立体结构复杂。有些 DNA 立体结构复杂 (如 GC rich、重复序列等) 时难以测序, 应改进测序方法。
- Q6. 质粒 DNA 的最小洗脱体积是多少?
- A6. 我们建议的洗脱体积为 30~100 μl , 此种洗脱体积下收率较好 (但要注意洗脱液需直接加至膜中心), 低于 30 μl 时收率会有所下降, 当对质粒 DNA 浓度要求较高时, 也可以减少洗脱液体积至 20 μl , 但回收率会略有下降, 应注意使用预热的洗脱液洗脱, 并在洗脱离心之前静置 1 分钟以上, 以增加洗脱效率。
- Q7. 提取得到的质粒有基因组 DNA 污染, 为什么?
- A7. ① 加入 Solution II 后所有的振荡要轻柔, 不可剧烈;
- ② 加入 Solution II 后裂解时间不宜过长, 不可超过 5 分钟;
- ③ 菌体培养时间不可过长, 培养 12~16 小时为宜。
- Q8. 提取得到的质粒有 RNA 污染, 为什么?
- A8. ① 确保 Solution I 中已经加入了 RNase A;
- ② 加入 RNase A 的 Solution I 应于 4°C 保存, 若保存超过 3 个月, RNase A 活性会下降, 可以重新额外添加 RNase A (Code No. 2158)。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201706Da