常 见 问 题

1. DNA 产量低

- 质粒拷贝数: 载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2~3 倍的产量波动， (每毫升培养过夜的菌液，高拷贝数的质粒载体产量为 3~16 μg)。 长片段质粒(>7KB)和表达型载体常以中低拷贝数为主，每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μg。
- 菌种问题：菌种保存过程中存在质粒丢失现象，养菌前最好先划线活化，以稳定产量。
- 细胞未充分裂解：细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬，成团的细菌因无法裂 解会降低产量。
- 试剂准备有误：Buffer P2 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PW 需加入乙醇稀释。

2. 基因组 DNA 污染

- 培养时间太长：菌液培养时间需控制在 12~16 小时。
- 裂解问题：加入 Buffer P2 时，必须轻柔颠倒混匀；处理多个样品时，加入 Buffer P2 时算起，总时间不要超过 5 分钟。

3. 下游实验结果不理想

- 质粒降解：用 endA+的菌株如 HB101 或其它野生型菌株，含有高丰度的核酸酶。
- 膜脱落: 硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的。 10,000 x g 离心 2 分钟后再把质粒转移至新的离心管中。

4. 中和后离心得不到上清

- 盐析出: 加入 Buffer P3 中和后，不能低于 20℃离心。低温时，上清会有大量的盐析出而造成堵柱。若室内温度过低，可将 Buffer P3 平衡至 37~50℃后使用。得到 的上清要尽快过柱。

ABP Biosciences

EasySC Plasmid Mini Purification Kit
质粒小提纯化试剂盒

（离心柱型）

产品概述

质粒小提纯化柱采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附质粒，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了质粒的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Elution Buffer)或水， 洗脱出滤膜上吸附的质粒。用质粒小提纯化柱提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

产品特点

- 独有的硅胶膜技术，在特定溶液环境下，对核酸的吸附能力强，改变条件，易洗脱核酸；
- 全自动装配，柱间及批间差异小，重复性好；
- 吸附柱底部采用鲁尔接口设计，便于离心液收集。

适用范围

适用于小量提取质粒 DNA。

ABP Biosciences Inc
安迪福诺生物科技（武汉）有限公司
地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号
光谷生物城生物创新园C2-4栋五楼
电话： 400-066-7718 邮箱： info@abpbio.com
网址： www.abpbio.com www.abpbio.com.cn

试剂盒组分

Kit Component	D100-1 (50 preps)	D100-2 (200 preps)
Buffer P1	15 mL	60 mL
Buffer P2	15 mL	60 mL
Buffer N3	20 mL	80 mL
Buffer PW*	15 mL	50 mL
Elution buffer	15 mL	25 mL
RNase A (10 mg/mL)	150 µL	600 µL
Mini Column	50	200
2 mL Collection Tube	50	200

***** Buffer PW 使用前须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

保 存 条 件

本产品除 RNase A 外，其它组份可在室温保存 12 个月。RNase A 室温运 输，收到产品后把 RNase A 保存于-20°C。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8°C 保存 6 个月。

实验准 备

1. 短暂离心 RNase 酶管，把全部 RNase A 转移至 Buffer P1 中，于 2-8°C 保存。
2. 第一次使用前，Buffer PW 按瓶子标签所示加入指定体积的无水乙醇。
3. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、 离心管。
4. 所有离心均在室温下进行，低温下离心会导致柱子堵塞。
5. 使用前观察溶液是否出现沉淀，若有沉淀可在 37°C 水浴中加热溶解并冷却至室温后再使用。

实验步骤

1. 细菌裂解：取 1-6 mL 菌液，于 10,000 × g 离心 1 分钟，尽可能地吸除上清。
   Note: (1) 高拷贝质粒推荐用 1-6 mL 菌液，低拷贝质粒推荐用 10 mL 菌液。
   (2) 如果收集的菌液较多，离心去上清后，在同一个离心管内再加入菌液，重复该步骤将菌液沉淀收集到一个离心管中。
2. 加入 250 µL Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋重悬细菌。
   Note: (1) 使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。
   (2) 对于低拷贝质粒，加大菌体用量的同时需按比例增加 Buffer P1, Buffer P2, Buffer P3 的用量。
3. 往重悬液中加入 250 µL Buffer P2，温和地上下翻转 8~10 次，室温放置 2 分钟，此时菌液变得澄清粘稠表明细菌已充分裂解 (总共操作时间不要超过 5 分钟)。
   Note: 上下翻转要温和，涡旋会引起基因组 DNA 污染。
4. 加入 350 µL Buffer N3，立即温和地上下翻转 8~10 次让溶液彻底中和。
   Note: 加入 Buffer N3 后应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。
5. 13,000 x g 离心 2 分钟。
   Note: 这一步须室温下离心，低温离心会引起 SDS 析出而无法获得澄清的上清液。
6. 将 DNA Mini Column 装在收集管中。将上一步所得的上清液转入柱子中，13,000 × g 离心 30~60 秒。弃去收集管中的废液，将柱子套回收集管中。
   Note: 为了增加质粒的回收效率，可将收集管中的溶液重新加入到吸附柱中重复该步骤。
7. 加入 600 µL Buffer PW (使用前检查是否已加入无水乙醇) 至柱子中，13,000 × g 离心 30~60 秒，倒弃滤液，把柱子套回收集管中。
8. 加入 600 µL Buffer PW (使用前检查是否已加入无水乙醇) 至柱子中，13,000 × g 离心 30~60 秒，倒弃滤液，把柱子套回收集管中。
   Note: Buffer PW 漂洗两次主要是除去多余的盐分。
9. 13,000 x g 离心 2 分钟, 去除残留漂洗液。
   Note: Buffer PW 漂洗后把柱子管盖打开放置数分钟以去除乙醇，否则多余的乙醇会影响后续的酶切反应、PCR 扩增等实验。
10. 把柱子套在一新的 1.5 mL 离心管中，室温放置 5-10 min，尽量去除膜上的乙醇。在柱子的膜中央加入 50-100 µL Elution Buffer 。室温放置 2 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟，回收提取的质粒。
    Note: 将洗脱液置于 65-70°C 水浴中预热，可提高洗脱效率；吸附和洗脱时可以适当地延长时间，增加提取纯化效率；若需要获得最高产量，可重复此步骤进行第二次洗脱。
11. 弃去柱子，把质粒保存于-20°C。