

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。

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。



EasyMag Plasmid Mini Purification Kit 质粒小提纯化试剂盒 (离心柱型)

产品概述

EasyMag 质粒小提纯化试剂盒采用超顺磁性粒子纯化技术, 在高盐和低 pH 条件下, 磁性粒子专一性地吸附 DNA; 而在低盐 或水溶液状态下, DNA 从磁性粒子上解吸附, 从而得到纯化。用磁珠法质粒小提纯化试剂盒配合相应的磁力架或核酸自动提取仪, 一天 1 人可处理 1000 人份的质粒提取工作, 大大节约了人力成本的投入。纯化的质粒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

- ❖ 高通量, 结合核酸自动提取仪每天可以提取上千质粒样品;
- ❖ 适用范围广, 可提取各种质粒;
- ❖ 高质量的质粒 DNA, 更佳的测序效果。

适用范围

适用于少量提取质粒 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	D101-1 (50 preps)	D101-2 (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 μ L	600 μ L
MagBinding Beads	2.5 mL	10 mL

* 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, MagBinding Beads 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 $^{\circ}$ C。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。MagBinding Beads 室温运输，收到产品后把 MagBinding Beads 保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

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 $^{\circ}$ 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. 使用前观察溶液是否出现沉淀，若有沉淀可在 37 $^{\circ}$ 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 \times 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 \times 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. 转移上清至一新的 2 mL 离心管中，加入等体积的乙醇和 50 μ L MagBinding Beads。涡旋混匀，震荡孵育 10 min。
7. 把离心管转移到磁力架上再室温静置 2 分钟，至溶液澄清。用移液枪小心吸弃上清，不要碰触磁珠。
8. 加入 600 μ L Buffer PW (使用前检查是否已加入无水乙醇) 至离心管中，用移液枪或涡旋仪充分混匀。然后把离心管转移到磁力架上再室温静置 2 分钟，至溶液澄清。用移液枪小心吸弃上清，不要碰触磁珠。
9. 重复第 8 步洗涤一次。
10. 保持样品始终处于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约 10 - 20 min。
11. 加入 50-100 μ L Elution Buffer 至离心管中，用移液枪或涡旋仪充分混匀。于 55 $^{\circ}$ C 烘箱中放置 4 分钟，然后把离心管转移到磁力架上再室温静置 2 分钟，至溶液澄清。用移液枪小心吸取上清，并转移到新的离心管中。
12. 把质粒保存于 -20 $^{\circ}$ C。