

FastPure Colored Endo-Free Plasmid Miniprep Kit Handbook FastPure 彩色去内毒素质粒小量提取试剂盒说明书

产品组成

| FastPure Colored Endo-Free Plasmid Miniprep Kit | | |
|---|-------------|--------------|
| 产品编号 | EK-1005-50T | EK-1005-100T |
| 纯化次数 | 50 次 | 100 次 |
| Buffer P1 (Pink) | 15mL | 30mL |
| Buffer P2 (Purple) | 15mL | 30mL |
| Buffer N3 (Yellow) | 20mL | 40mL |
| Buffer EF | 60mL | 120mL |
| Buffer PW | 12mL | 24mL |
| Buffer EB | 10mL | 20mL |
| RNase A Solution (10mg/mL) | 150μL | 300μL |
| Plasmid Mini Columns | 50 个 | 100 个 |
| 2mL Collection Tubes | 50 个 | 100 个 |
| 使用手册 | 1 | 1 |

产品介绍

本试剂盒采用彩色溶液配方，提取步骤更清晰可视。同时应用先进的硅胶膜吸附技术，操作简单、快速。菌体经碱裂解法处理后通过离心吸附柱，专一性结合 DNA，洗去杂质，高效快速提取多至 40μg 的质粒 DNA。本试剂盒使用独特缓冲液配方，最大限度去除蛋白杂质、内毒素及其它有机化合物，每次可处理 1-5mL 菌液。得到的 DNA 比传统试剂盒纯度更高，可直接用于转染、酶切、转化、测序及 PCR 等分子生物学实验。

存储条件

RNase A Solution 收到后请冻于-20°C，加至 Buffer P1 后混合液保存于 4°C。除 RNase A Solution 外，其余组分在室温（15-25°C）密封、避光干燥保存至少 12 个月。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇（96%-100%）
- 无菌 1.5mL/2mL 离心管

开始前注意事项

- Buffer P1 为粉红色澄清溶液，Buffer P2 为紫红色澄清溶液，Buffer N3 为黄色澄清溶液。
- Buffer P2 和 N3 如有混浊现象，可在 37°C 水浴中加热 5-10min 即可恢复澄清。
- 处理低拷贝质粒时，按比例扩大 Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer N3 的用量，可处理 5~10mL 细菌培养液。
- 质粒提取所有步骤都在室温（15-25°C）下进行。
- 试剂颜色不会影响到质粒提取的浓度及纯度，请放心使用。

开始前试剂准备

- 短暂离心 RNase A Solution 管，把全部 RNase A Solution 转移至 Buffer P1 中，并于 2-8°C 保存。
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW，于室温密封保存。

DNA 浓度及纯度检测：

- 回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。
- DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50μg/mL 双链 DNA、40μg/mL 单链 DNA。
 OD260/OD280 比值应为 1.7-2.0，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用 ddH₂O 比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

操作步骤:

1. 将含质粒的菌种接种 (1:500-1:1000 接种) 于含 1~5mL LB-抗生素培养液的 10-20mL 培养管中, 37°C 摇床培养 12~16h。
2. 将菌液加入离心管中, 使用常规台式离心机, $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$ 离心 1min, 尽量吸除上清 (菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。
3. 倒弃培养基, 在吸水纸轻轻拍打吸尽残液 (或用吸头吸尽)。加入 250 μ L Buffer P1 (请先检查是否已加入 RNase A), 高速涡旋 (或吸头吹打) 重悬细菌至无菌块。
加完 Buffer P1 后溶液为粉红色, 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。
4. 往离心管中加入 250 μ L Buffer P2, 温和颠倒混匀 8~10 次。
不要涡旋! 轻轻颠倒混匀即可, 涡旋会引起细菌基因组 DNA 污染。溶液变得粘稠而透亮表明细菌已充分裂解。如有必要, 可室温放置 2min, 这一步操作时间不要超过 5min 以免质粒受到破坏。此时溶液应变为紫色。
5. 向离心管中加入 350 μ L Buffer N3, 立即温和地上下翻转 8~10 次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀。最大转速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 10min。
不要涡旋! 加入 Buffer N3 后立即温和翻转, 观察到溶液由紫色转变为均匀黄色, 并伴随大量白色絮状沉淀, 即表示中和完全。
注意: 如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。
6. 将上一步收集的上清液用移液器吸入到吸附柱中, 注意尽量不要吸到沉淀。 $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$ 离心 30s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
这一步须室温离心, 低温离心会引起 SDS 析出而无法获得澄清的上清液。吸附柱单次上柱最大容量为 700 μ L, 请勿超过吸附柱单次上柱最大容量, 可分批多次离心。
7. 向吸附柱中加入 500 μ L 去内毒素液 Buffer EF, $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$ 离心 30s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。
8. (选做) 重复操作步骤 7
重复一次 Buffer EF 清洗吸附柱可以更好去除内毒素及其它蛋白质的影响。
9. 向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液 Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), $\geq 8000 \times g (\geq 10,000 \text{ rpm})$ 离心 30s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

10. 重复操作步骤 9 一次。
11. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 最大转速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2min 以干燥吸附柱膜, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。
注意: 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响。
12. 将吸附柱转移至新的无菌 1.5 mL 离心管中, 开盖室温静置 5-10 min 以彻底去除残留乙醇。后加入 30-60 μ L Buffer EB (或无菌 ddH₂O) 至柱子的膜中央并盖上盖子静置 1-2min, 最大转速 ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2min 以洗脱 DNA 至离心管。
柱子最低的洗脱体积为 30 μ L, 低于 30 μ L 会导致洗脱效率下降。30 μ L 可洗脱 60-70% 的质粒 DNA, 50 μ L 可洗脱出 80-85% 的质粒 DNA。若需要获得最高产量, 可重复操作本步骤进行第二次洗脱。Buffer EB 在 55-60°C 预热后加入膜中央洗脱也可提高质粒获得率。
13. 弃去柱子, 将质粒 DNA 溶液于 -20°C 保存或进行下游实验。

常见问题:**1. 质粒 DNA 产量低**

- **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 需加入乙醇稀释或体积不准确 (乙醇浓度需控制在 80%)。
- **质粒拷贝数:** 载体应拷贝数差异会造成质粒产量明显波动。高产量载体常有 2~3 倍的产量波动。长片段质粒 (>7kb) 和表达型载体常为中低拷贝数质粒, 每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μ g, 需加大菌液量提取。
- **菌种问题:** 菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 培养细菌前最好划线活化以稳定产量。

2. 基因组污染

- **培养时间过长:** 培养时间应控制到 12~16 个小时。
- **裂解问题:** 加入 Buffer P2 后应该轻柔颠倒混匀; 处理多个样品时, 加入 Buffer P2 时算起, 总时间不要超过 5min。