

### ※ 三 吸附柱的相关资料:

**吸附柱的有效容积:** 是指吸附柱内的液体在经过离心后不滞留于吸附柱内的容积。我们生产的吸附柱有效容积为800  $\mu$ l, 如果上柱量超过此体积, 请分次上柱。

**柱吸附力:** 是指吸附柱在饱和状态下可以最大吸附的核酸量。如果没有进行预实验, 请不要试图通过增加样品量的方法来提高提取的核酸量, 因为吸附柱达到饱和后, 再多的核酸也不能被吸附柱吸附, 造成样品的浪费。下表是我们生产的不同吸附柱的柱吸附力:

吸附柱类型	适用试剂盒	柱吸附力
CP	质粒提取	20 $\mu$ g
CA1	凝胶回收	10 $\mu$ g
CA2	产物纯化	10 $\mu$ g

**得率:** 影响得率的最关键的因素有两个: 片段大小和核酸含量。片段太小, 就不能与吸附柱有效结合, 得率降低, 如100bp片段; 片段太大, 与吸附柱结合过于牢固, 不易洗脱, 得率也变低, 如大于10kb的片段。吸附柱总是会吸附一些核酸不能被有效洗脱下来, 当核酸含量过低时, 被吸附柱滞留的核酸含量将大大上升, 得率降低; 而当核酸含量过高时, 超过了吸附柱的最大吸附力, 得率也会下降。因此, 想要更进一步提高得率的话, 可以选择以下方法:

- 1 将上柱后的洗脱液再次上柱, 该方法适于核酸含量较低的样品。
- 2 延长洗脱时间, 该方法适于较大的片段和核酸含量高的样品。
- 3 两次分布洗脱, 该方法适于较大的片段和核酸含量高的样品。

### 普通质粒小提试剂盒 (目录号: RTP2102)

#### ※ 试剂盒内容及保存:

试剂盒组成	RTP2102-02 (100次)	RTP2102-03 (200次)	贮存方式
RNase A	300 $\mu$ l	600 $\mu$ l	-20°C
Lysis Dye	600 $\mu$ l	2 $\times$ 600 $\mu$ l	室温
溶液P1	30ml	60ml	室温 (加入RNase A后2-8°C保存)
溶液P2	30ml	60ml	室温
溶液P3	40ml	80ml	室温
漂洗液PW (浓缩液)	25ml	2 $\times$ 25ml	室温
洗脱缓冲液EB	15ml	15ml	室温
质粒吸附柱CP	100个	2 $\times$ 100个	室温
收集管 (2ml)	100个	2 $\times$ 100个	室温
说明书	1份	1份	

#### ※ 储存条件和效期:

本试剂盒在室温 (25°C左右) 干燥条件下, 可保存1年; 更长时间的保存可置于2-8°C。

2-8°C保存条件下, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于37°C下溶解沉淀至溶液澄清后再使用。

单独包装的RNase A 在-20°C可稳定保存1年以上。

加入RNase A后的溶液P1应置于2-8°C保存, 可稳定保存半年。

#### ※ 产品简介及使用说明:

本试剂盒采用经典的碱裂解法裂解细菌, 再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合DNA的特性, 可以从1-5ml大肠杆菌LB培养液中快速提取3-20  $\mu$ g纯净的高拷贝质粒DNA。提取的质粒可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接和

转化等实验。然而，对质粒纯度要求更高的转染实验（要求无内毒素），此试剂盒不能达到要求。另外，尽管该试剂盒可以抽提较大的质粒（>10kb），但我们不推荐使用。如果一定要使用，请参考以下方法：

加大菌体使用量（使用5–10ml过夜培养物），同时按照比例增加P1、P2、P3的用量；洗脱缓冲液应在65–70°C 预热，在吸附和洗脱时可以适当的延长延长时间，以增加提取效率，其它步骤相同。

### ※ 产品特点：

1. 使用了Lysis Dye，菌体裂解是否完全一目了然。由于判断菌体裂解和中和是否彻底更主要取决于操作者的经验，所以我们增加了Lysis Dye（一种能使裂解/中和体系变换颜色的试剂）来帮助观察裂解/中和的程度。加入P1混匀后，溶液呈混浊的红色；加入P2后，Lysis Dye使溶液变为澄清的红色，裂解是否完全只要观察红色背景下溶液是否均匀即可，如果红色非常均一，表明裂解充分。在完全裂解的体系中加入P3混匀后，体系立即变为亮黄色，任何红色颗粒的残留表明没有完全混匀或者中和不彻底。

### ※ 准备工作：

1. 将试剂盒附带的RNase A全部加入到溶液P1中（如30ml P1中加入300 μl RNase A），混匀后4°C 贮存。
2. 按照标签所示在漂洗液PW中加入无水乙醇，混匀后盖紧瓶盖后室温贮存备用。
3. 每次使用前请检查溶液P2，溶液P3是否有沉淀生成，如果出现沉淀，37°C 温浴至沉淀溶解后再使用。

### ※ 标准操作步骤（不使用Lysis Dye）：

如非指出，所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1. 取1–5ml过夜培养的菌液加入离心管中，10,000g离心1分钟，尽量吸除上清。

注：● 关于转速的说明，请参见“用前须知”（Page 1），下同。

- 菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中。
2. 向菌体沉淀的离心管中加入250 μl溶液P1（请先检查是否已加入RNaseA），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。  
注：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。
  3. 加入250 μl溶液P2，温和地上下翻转6–8次使菌体充分裂解。  
注：温和地混合，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA；所用时间绝对不应超过5分钟，以免质粒受到破坏。
  4. 加入350 μl溶液P3，立即温和地上下翻转6–8次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀。10,000g 离心10分钟。  
注：P3加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
  5. 小心地将上清（700–750 μl）转移到吸附柱CP中（吸附柱放入收集管中），10,000g离心30–60秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP重新放回收集管中。
  6. 向吸附柱CP中加入700 μl漂洗液PW（请先检查是否已加入无水乙醇），10,000g 离心30–60秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP重新放回收集管中。
  7. 向吸附柱CP中加入500 μl漂洗液PW，10,000g 离心30–60秒，倒掉收集管中的废液。
  8. 将吸附柱CP置于收集管中，10,000g 离心2分钟。  
注：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，绝对不可省略，因为漂洗液中乙醇的残留会影响后续实验（酶切，PCR等）。
  9. 将吸附柱CP置于一个干净的1.5ml离心管中，向吸附膜的中央部位悬空滴加30–100 μl洗脱缓冲液EB，室温放置2分钟，10,000g离心2分钟将质粒溶液收集到离心管中，–20°C 保存。  
注：● 为了增加质粒的回收效率，可将得到的洗脱液重新加入离心吸附柱中，再次离心收集。  
● 洗脱缓冲液体积不应少于30 μl，体积过小影响回收效率。  
● 洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0–8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。

### ※ 使用Lysis Dye的标准操作步骤:

如非指出, 所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心。

1. 取1–5ml过夜培养的菌液加入离心管中, 10,000g离心1分钟, 尽量吸除上清。**注: 菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中。**
2. 向菌体沉淀的离心管中加入250  $\mu$ l溶液P1 (请先检查是否已加入RNaseA) 和5  $\mu$ l Lysis Dye, 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀, 彻底混匀后溶液为浑浊的红色(图一)。**注: 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。**



加入P1  
图一

加入P2  
图二

加入P3, 未混匀  
图三

混匀后对比  
图四

3. 加入250  $\mu$ l溶液P2, 温和地上下翻转6–8次使菌体充分裂解, 此时溶液变为均一的红色(图二)。**注: 温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免污染基因组DNA; 所用时间绝对不应超过5分钟, 以免质粒受到破坏; 红色溶液应该均一, 看不见白色颗粒。**
4. 加入350  $\mu$ l溶液P3, 立即温和地上下翻转, 充分混匀, 混匀充分的标志是溶液完全呈黄色絮状, 如有可见红色, 说明混匀不彻底(图三)。10,000g离心10分钟。**注: P3加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。如果离心后上清中还有微小沉淀, 可再次离心后取上清。**
5. 小心地将上清(700–750  $\mu$ l)转移到吸附柱CP中(吸附柱放入收集管中), 10,000g离心30–60秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CP重新放回收集管中。
6. 向吸附柱CP中加入700  $\mu$ l漂洗液PW(请先检查是否已加入无水乙醇), 10,000g离心30–60秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CP重新放回收集管中。
7. 向吸附柱CP中加入500  $\mu$ l漂洗液PW, 10,000g离心30–60秒, 倒掉收集管中的废液。
8. 将吸附柱CP置于重新放回收集管中, 10,000g离心2分钟。

**注: 此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 绝对不可省略, 因为漂洗液中乙醇的残留会影响后续实验(酶切, PCR等)。**

9. 将吸附柱CP置于一个干净的1.5ml离心管中, 向吸附膜的中央部位悬空滴加30–100  $\mu$ l洗脱缓冲液EB, 室温放置2分钟, 10,000g离心2分钟将质粒溶液收集到离心管中,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

- 注:**
- 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的洗脱液重新加入离心吸附柱中, 再次离心收集。
  - 洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。
  - 洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0–8.5范围内, pH值低于7.0会降低洗脱效率。

### ※ 背景知识:

**质粒提取原理:** 碱裂解法是目前应用最为广泛的提取质粒的方法, 本试剂盒既是采取这种方法进行质粒的提取。其原理是: 大肠杆菌细胞在碱作用下裂解(溶液P2处理), 释放细胞内容物。当溶液回复到中性条件下(加入P3后), 细菌基因组、变性蛋白质以及细胞碎片结合在一起形成沉淀, 而长度较短的质粒DNA留在上清中, 离心去除沉淀后可以从上清中回收质粒DNA。本试剂盒与经典的质粒提取方法(“分子克隆实验指南”中的方法)不同之处在于质粒纯化方式不同。经典的纯化方法使用酚/氯仿抽提去除蛋白污染, 再用乙醇沉淀得到纯化的质粒DNA。本试剂盒使用硅胶膜为吸附材料, 采用“高盐结合, 低盐洗脱”的原理纯化质粒DNA, 即在高盐环境下质粒DNA吸附到硅胶膜上, 然后用低盐缓冲液将质粒从硅胶膜中洗脱下来。与经典的纯化方法相比, 采用硅胶膜吸附的方法操作更加方便快捷, 得到质粒纯度更高。

### ※ 影响质粒提取的因素:

- **质粒种类:** 低拷贝质粒如pBR322在提取时要用氯霉素处理对质粒进行选择扩增, 提取时使用的菌液要更多一些, 一般用5–10ml; 高拷贝质粒如pUC系列, 无需用氯霉素处理, 使用1–5ml菌液提取即可满足一般实验要求, 如酶切, PCR等。
- **宿主菌种类:** 大肠杆菌endA<sup>+</sup>菌株如HB101含有较高的核酸内切酶活性, 容易降解质粒DNA, 故质粒提取时尽量选取endA<sup>-</sup>菌株如DH5 $\alpha$ , Top10等。