

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:70903-100

CAT#:70903-15(临时规格)

常温运输及保存

**TIANDZ**

一步法质粒 DNA<sub>OUT</sub>

One-Step Plasmid DNA<sub>OUT</sub>

使用手册 V3.8

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

## 产品及特点

基于碱变性原理的质粒小量制备(Miniprep)是分子克隆研究中最常用的方法之一，其操作包括三种溶液处理，一般需要 30 分钟左右的时间才能得到可以上柱的质粒 DNA 初提液。本产品采用天恩泽基因自主开发的一步式细菌裂解技术，只需要一种溶液处理即可以完成细菌裂解，并且裂解物可以直接上柱纯化质粒 DNA，比碱变性法快捷约 20 分钟。本产品的主要特点是：

1. 一步式，提取一个样品只需 5 分钟左右，比传统的碱变性方法快捷。
2. 适用于高拷贝、中拷贝和低拷贝质粒的提取。适用于各种 E.coli 宿主菌。
3. 质粒 DNA 产量跟经典碱变性法相当，一般 1-5mL 可以得到 3-15ug (对低拷贝质粒) 和 5-35ug (对高拷贝质粒)。
4. 所得质粒 DNA 呈超螺旋结构的比例比碱变性法更高。
5. 基因组 DNA 污染少。但由于操作太快，溶液中的 RNase 来不及降解 RNA，一般会有少量 RNA 污染，但不影响后续实验。
6. 可以直接用于电泳、酶切、PCR、细菌转化、分子克隆、测序等后续实验。

## 规格及成分

成份	编号	小纸盒包装 (15 次)	大纸盒包装 (100 次)
一步法质粒 DNAout 溶液 A	70903a	10.5 mL	70 mL
离心吸附柱(宽口)	60911	15 套	50 套×2
通用洗柱液	60408	15 mL	50 mL×2
DNA 洗脱液 2.0	111205	10 mL	10 mL
使用手册	70903sc	1 份	1 份

## 运输及保存

常温运输及保存，溶液 A 长期保存需要放 4℃，有效期一年。

## 自备试剂

无

## 使用方法

- 1、用塑料离心管收集 0.5-5 mL 过夜培养的饱和新鲜菌液，室温 14000g 离心半分钟，弃上清（培养基）。也可以使用-20℃冻存的细菌沉淀和 4℃放置过夜的饱和细菌培养液，但质粒回收效率稍低。如果是中拷贝和高拷贝质粒，使用 1.5mL 菌液即可，如果是低拷贝质粒，最好使用 3-5mL 菌液。常见质粒拷贝数请参考附表。
- 2、在细菌沉淀中加入 700uL 溶液 A，充分吹打或涡旋振荡半分钟。
- 3、将裂解液全部转移到离心吸附柱中，直接离心。如果静置 3-5 分钟后再离心，会提高质粒产量 10%左右。
- 4、室温 14000g 离心 1 分钟，弃穿透液。如果使用 3-5mL 起始菌液，则此步的离心时间可以延长 1 分钟以确保所有液体成功过柱，吸附柱中没有残留液体。
- 5、在离心吸附柱中加入 700uL 的通用洗柱液，室温 14000g 离心半分钟，弃穿透液。
- 6、室温 14000g 离心半分钟，甩尽残留液体。**注意：此步不能省略。**

- 7、将离心柱置于一个自备的 1.5 mL 塑料离心管中,在离心柱中加入 30-50uL DNA 洗脱液 2.0(对低拷贝质粒建议用 30uL 洗脱,对高拷贝质粒建议用 50uL 洗脱)。
- 8、室温 14000g 离心半分钟,离心管底溶液即质粒 DNA,可以直接用于后续实验(浓度测定、酶切、电泳和测序)或放冰箱长期保存。

注意:本方法提取的质粒 DNA 有如下特点:

- 1、因为没有使用剧烈的碱变性步骤,所以质粒呈现天然的超螺旋结构的比例较大。
- 2、由于整个操作非常快速,又没有使用碱来降解 RNA,所以试剂中的 RNase 都来不及把细菌的内源 RNA 彻底降解,故所得质粒比碱变性法提取的质粒有更多的 RNA 污染,因此不建议使用测 OD 的方法确定质粒 DNA 的浓度,故最好采用电泳比较法,即通过比较质粒 DNA 跟浓度已知的 DNA marker 的相对亮度来确定质粒的浓度。注意:RNA 污染一般不影响电泳、酶切和测序。
- 3、如果需要进一步去除 RNA 污染,可以在第 5 步后再增加一步洗柱操作,即在离心吸附柱中加入 300uL 的通用洗柱液,室温 14000g 离心半分钟,弃穿透液,再进入下一步。
- 4、一般 1-5mL 菌液可以得到 3-15ug (对低拷贝质粒)或 5-35ug (对高拷贝质粒)质粒 DNA。如果需要进一步提高质粒 DNA 产量,可以再加 30-50uL DNA 洗脱液 2.0 到离心吸附柱中再次洗脱,可以得到相当于第一次洗脱量 10-20%的质粒 DNA。也可以将第一次洗脱得到的质粒 DNA 溶液再加入到离心吸附柱中洗脱,可以使质粒 DNA 产量提高 10-20%。

## 背景信息

### 附表:常见质粒拷贝数/每个宿主菌

注意:高拷贝是指每个宿主菌含 300 拷贝或以上的质粒,中拷贝指每个宿主菌含 20-100 拷贝的质粒,低拷贝指每个宿主菌含 20 拷贝以下的质粒。

质粒名称	拷贝数/细胞	复制起始子	质粒类型
pTZ 系列	>1000	pMB1	高拷贝质粒
pUC 系列	500 - 700	pMB1	高拷贝质粒
pBluescript 系列	300 - 500	ColE 和 F1	高拷贝质粒
pGEM 系列	300 - 500	pMB1	高拷贝质粒
pBR322	15 - 20	pMB1	低拷贝质粒
pET 系列	15 - 20	pBR322	低拷贝质粒
pGEX 系列	15 - 20	pBR322	低拷贝质粒
pColE1	15 - 20	ColE1	低拷贝质粒
pR6K	15 - 20	R6K	低拷贝质粒

	pACYC	10 - 12	p15A	低拷贝质粒
	pSC101	~5	pSC101	低拷贝质粒
	SuperCos	10-20	pMB1	Cosmid
	pWE15	10-20	ColE1	Cosmid

疑难解答	可能出现的问题	可能原因	建议解决方法
	质粒 DNA 产量低	抗菌素失活使质粒部分丢失	
细菌裂解率低			在加入溶液 A 后细菌沉淀没有充分混匀，可漩涡振荡使之充分混匀，不要有块状物
细菌在 4℃ 放太久			立即使用新鲜菌液或将新鲜菌液离心去上清后 -20℃ 冻存细菌沉淀
细菌培养物生长时间过长或不新鲜			37℃ 培养时间不要超过 16 小时，不要在分离质粒前长时间存放细菌培养物
洗脱 DNA 时管底有白色沉淀	细菌中污染了真菌		重新培养细菌
OD <sub>260/280</sub> 不到 1.8	细菌量过多		勿使用超过 5mL 的饱和菌液
	RNA 污染		可以用通用洗柱液洗再洗 1-2 次
	蛋白质污染		可以用通用洗柱液洗再洗 1-2 次