

AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒

本试剂盒采用改进的 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜选择性地吸附 DNA 的方法达到快速纯化质粒 DNA 的目的。适合于从 1-4 ml 细菌培养物中提取多至 20 µg 高纯的质粒 DNA，用于测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	AP-MN-P-4	AP-MN-P-50	AP-MN-P-250
制备次数	4 preps	50 preps	250 preps
制备管	4	50	250
2 ml 离心管	4	50	250
1.5 ml 离心管	4	50	250
RNase A	10 µl	30 µl	150 µl
Buffer S1	2 ml	15 ml	75 ml
Buffer S2	2 ml	15 ml	75 ml
Buffer S3	2.5 ml	21 ml	105 ml
Buffer W1	2.8 ml	28 ml	135 ml
Buffer W2 concentrate	2.4 ml	24 ml	2×72 ml
Eluent	1 ml	5 ml	25 ml
说明书	1	1	1

RNase A: 50 mg/ml，室温可贮存 6 个月，长期贮存于-20°C。

Buffer S1: 细菌悬浮液。加入 RNase A 后，混合均匀，4°C 贮存。

Buffer S2: 细菌裂解液（含 SDS/NaOH），室温密闭贮存。

Buffer S3: 中和液，室温密闭贮存。

Buffer W1: 洗涤液，室温密闭贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前，按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇（可用 100%乙醇或 95%乙醇）。混合均匀，室温密闭贮存。

Eluent: 洗脱液，室温密闭贮存。

二、注意事项

Buffer S2、Buffer S3和Buffer W1含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

三、实验准备

1. 第一次使用前，RNase A全部加入Buffer S1中，4°C贮存。
2. 准备无核酸和核酸酶污染的Tip头、离心管。
3. 第一次使用前，Buffer W2 concentrate中加入指定体积的无水乙醇。
4. 使用前，检查Buffer S2是否出现沉淀，应于37°C温浴加热溶解并冷却至室温后再使用。

四、操作步骤

1. 取 1-4 ml 在 LB 培养基中培养过夜的菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），12,000×g 离心 1 min，弃尽上清。
2. 加 250 μl Buffer S1 悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。
 - * 确认 Buffer S1 中已加入 RNase A。
3. 加 250 μl Buffer S2，温和并充分地上下翻转 4-6 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。此步骤不宜超过 5 min。
 - * Buffer S2 使用后立即盖紧瓶盖，以免空气中的 CO₂ 中和 Buffer S2 中的 NaOH，降低溶菌效率。
 - * 避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。
 - * 此步骤不宜超过 5 min。
4. 加 350 μl Buffer S3，温和并充分地上下翻转混合 6-8 次，12,000×g 离心 10 min。
 - * 避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。

步骤 5~7 可以选择负压法或离心法纯化质粒 DNA。

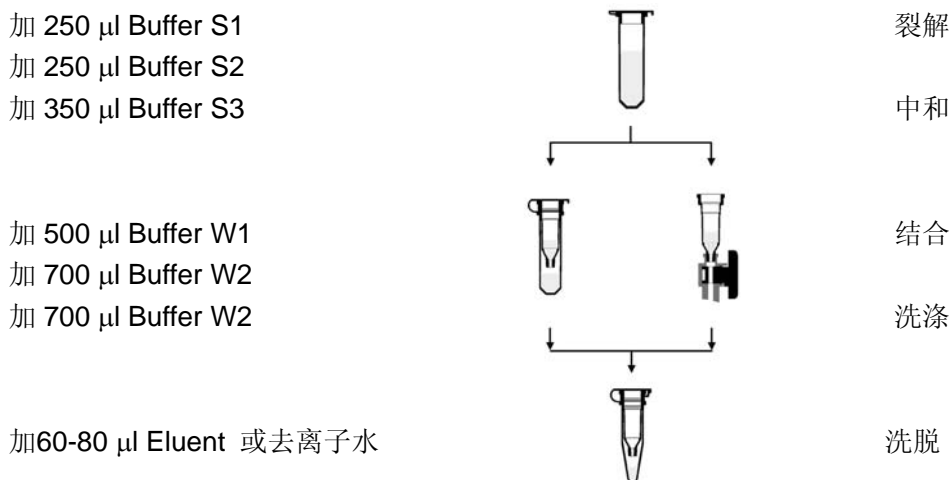
A. 负压法

- 5A. 将质粒 DNA 制备管插到负压装置的接口上。吸取步骤 4 中的离心上清并转移到制备管中，开启并调节负压至-25-30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。
- 6A. 加 500 μl Buffer W1，吸尽管中溶液。
- 7A. 加 700 μl Buffer W2，吸尽管中溶液；以同样的方法再用 700 μl Buffer W2 洗涤一次。
 - * 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
 - * 两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。
- 8A. 将制备管置于 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中，12,000×g 离心 1 min。

B. 离心法

- 5B. 吸取步骤 4 中的离心上清并转移到制备管（置于 2 ml 离心管（试剂盒内提供）中）， $12,000\times g$ 离心 1 min，弃滤液。
- 6B. 将制备管置回离心管，加 500 μl Buffer W1， $12,000\times g$ 离心 1 min，弃滤液。
- 7B. 将制备管置回离心管，加 700 μl Buffer W2， $12,000\times g$ 离心 1 min，弃滤液；以同样的方法再用 700 μl Buffer W2 洗涤一次。弃滤液。
- * 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
 - * 两次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。
- 8B. 将制备管置回 2 ml 离心管中， $12,000\times g$ 离心 1 min。
9. 将制备管移入新的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加 60-80 μl Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。 $12,000\times g$ 离心 1 min。
- * 将 Eluent 或去离子水加热至 65°C 将提高洗脱效率。

五、流程图



六、常见问题分析

主要问题	原因	建议	
得率低或纯化不到质粒	1. 质粒丢失	在含有新鲜抗生素的平板上重新划甘油菌培养。若当前使用的是氨苄青霉素，可以考虑试用羧苄青霉素。如果有必要，可重新转化质粒或使用不同的宿主菌。	
	2. 细菌裂解不完全	1) 菌量过多 2) Buffer S2 过期	将菌量减少为原先的一半（实际操作中可按实验情况相应调整）。 Buffer S2 中的 NaOH 被空气中的 CO ₂ 中和。使用完要立即拧紧瓶盖。
	3. 细菌重悬不完全		在加入 Buffer S1 后注意观察细菌是否完全悬浮、是否有菌块残留。
	4. 质粒过早的被洗脱		确保 buffer W2 中已经加入正确体积的 95-100%无水乙醇。
	5. 洗脱效率低	1) 膜过干	制备管在负压装置上抽干时间不宜过长。 洗脱液或者去离子水 65°C 预热以及增加洗脱时间至 5min 都可提高洗脱效率。
DNA 纯度低 高纯度的质粒 A _{260/280} 比值通常在 1.7-1.9 之间。低于 1.7 考虑蛋白质污染，高于 1.9 考虑 RNA 污染。	1. A _{260/280} 比值过低 表现为琼脂糖凝胶电泳的背景底色亮和酶切效率低	1) 菌量过多 2) 加入 Buffer S1 后菌体未完全悬起 3) 加入 Buffer S2 后裂解不完全 4) 加入 Buffer S3 后中和不完全	
	2. A _{260/280} 比值过高 表现为电泳时会出现 RNA 条带	1) Buffer S1 中未加入 RNase A 2) Buffer S1 保存不当，或者已经过期，RNase A 活性下降 3) 菌量过多 4) 加入 Buffer S1 后菌体没有完全悬起 5) 加入 Buffer S2 后裂解不完全	

主要问题	原因	建议																		
琼脂糖凝胶中质粒条带模糊 通常质粒条带模糊是由于降解影响，而此降解可能是宿主菌自身引起的，也可能是纯化过程中造成	1. 使用 endA+宿主菌 endA+是宿主菌中含有 endA 基因型，表达 Endonuclease I 内源核酸酶 部分 endA+宿主菌列表见下 <table border="1" data-bbox="400 476 949 864"> <tr> <td>BL21(DE3)</td> <td>MC1061</td> </tr> <tr> <td>BMH71-18</td> <td>NM522 (NM 系列宿主菌都是 End A+)</td> </tr> <tr> <td>CJ236</td> <td>P2392</td> </tr> <tr> <td>ES1301</td> <td>PR700 (PR 系列宿主菌都是 End A+)</td> </tr> <tr> <td>HB101</td> <td>Q358</td> </tr> <tr> <td>JM83</td> <td>RR1</td> </tr> <tr> <td>JM101</td> <td>TB1</td> </tr> <tr> <td>JM110</td> <td>TG1</td> </tr> <tr> <td>LE392</td> <td>Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 End A+)</td> </tr> </table>	BL21(DE3)	MC1061	BMH71-18	NM522 (NM 系列宿主菌都是 End A+)	CJ236	P2392	ES1301	PR700 (PR 系列宿主菌都是 End A+)	HB101	Q358	JM83	RR1	JM101	TB1	JM110	TG1	LE392	Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 End A+)	尽量使用 endA-宿主菌。 确保 Buffer W1 洗涤 1 次。
	BL21(DE3)	MC1061																		
BMH71-18	NM522 (NM 系列宿主菌都是 End A+)																			
CJ236	P2392																			
ES1301	PR700 (PR 系列宿主菌都是 End A+)																			
HB101	Q358																			
JM83	RR1																			
JM101	TB1																			
JM110	TG1																			
LE392	Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 End A+)																			
	2. 菌培养时间过长 3. 存放/处理收集菌时间过长 4. 存放收集菌的方式不对 5. 加入 Buffer S2 后裂解不完全 6. 加入 Buffer S3 后中和不完全	不要超过 16 小时 存放 3 个月以内 请于-20℃以下存放																		
琼脂糖凝胶电泳出现多个条带	正常质粒电泳会出现多条带。清晰的主带是质粒的超螺旋结构。在超螺旋主带的上方通常有 1-3 条电泳更慢的条带，一般认为是开环质粒和质粒二聚体(或者不同的交联形式)。偶尔也会有在超螺旋条带前面出现微弱的称为“不可逆变性质粒”条带，这个是碱裂解的副产品。大多数酶对这种质粒不起作用，包括限制性和测序的酶。如果在 S2 环境中时间过长，会使得不可逆变性的质粒含量增加。	Buffer S2 裂解不要超过 5min.																		

主要问题	原因	建议
琼脂糖凝胶电泳背景底色亮 细菌碎片、基因组和 RNA 污染都显现高亮电泳背景	<ol style="list-style-type: none"> 1. 培养时间过长, 大量细菌死亡和产生大量菌体碎片 2. 收集的细菌保存/处理时间过长 3. 保存收集细菌的方法不对 4. 菌量过多 5. 加入 Buffer S2 后裂解不完全 6. 加入 Buffer S3 后中和不完全 	
基因组 DNA 污染	<ol style="list-style-type: none"> 1. 培养时间过长, 大量细菌死亡和产生大量菌体碎片 2. 菌量过多 3. 加入 Buffer S2 后震荡剧烈/裂解不完全/作用时间太长 4. 加入 Buffer S3 后剧烈震荡/中和不完全 	
RNA 污染 少量的 RNA 污染对于一般实验来说是没有影响的。	参见 “ A₂₆₀/A₂₈₀ 比值过高 ”	
DNA 酶切效果不好 酶切效果不好可能是有抑制剂的污染（比如盐和乙醇）或者质粒修饰。偶尔，质粒在传代几次后会产生缺失。在排除其他原因的情况下，要通过测序才能确定。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 盐污染 2. 乙醇污染 3. Buffer S2 作用时间过长 4. 核酸酶污染引起的质粒降解 5. 质粒序列缺失 	确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。 在最后一次 Buffer W2 洗涤后可将制备管离心时间由原来 1min 增加至 2min。