

## AxyPrep 质粒中量制备试剂盒

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 30-100 ml 细菌培养物中提取多至 100 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-MD-P-2	AP-MD-P-10	AP-MD-P-25
制备次数	2 preps	10 preps	25 preps
中量滤器	2	10	25
中量制备管	2	10	25
1.5 ml 离心管	4	20	50
塑料扳手	1	1	1
RNase A	22 µl	120 µl	270 µl
Buffer S1	11 ml	55 ml	125 ml
Buffer S2	11 ml	55 ml	125 ml
Buffer S3K	11 ml	55 ml	125 ml
Buffer B	11 ml	55 ml	125 ml
Buffer W1	16 ml	80 ml	2×100 ml
Buffer W2 concentrate	7.2 ml	36 ml	72 ml
Eluent	1.5 ml	6 ml	20 ml
说明书	1	1	1

**RNase A:** 50 mg/ml，室温贮存 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 S3K:** 中和液，室温密闭贮存。

**Buffer B:** DNA 结合溶液，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

1. 细菌过量将影响细菌裂解及质粒DNA的释放。
2. 在步骤3和步骤4中操作必须温和。剧烈摇晃，将导致基因组DNA的污染。但混合必须充分，否则影响得率。
3. 在加入Buffer S3K时，蛋白质和基因组DNA形成粘稠的白色絮状沉淀，必须充分混合均匀，使凝集块中间也得到充分中和凝结。

4. 将Eluent或去离子水加热至65°C，有利于提高洗脱效率。
5. DNA分子呈酸性，建议在2.5 mM Tris-HCl, pH 7.0-8.5 洗脱液中保存。
6. Buffer S2、Buffer S3K、Buffer B和 Buffer W1试剂含刺激性化合物，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. 第一次使用时，在 Buffer W2 concentrate 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
3. 准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
4. 4°C预冷Buffer S3K和Buffer B。
5. 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。
6. 需要使用负压装置。（推荐使用Axygen配套负压装置 AxyVac Cat No. : AP-VM）

### 四、操作步骤

1. 取 30 ml 在 LB 培养基中培养过夜的高拷贝数质粒菌液，或 100 ml 过夜培养的低拷贝质粒菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少）， $\geq 3,000 \times g$  离心 8 min，弃上清。将离心管倒置于纸上 1min，除尽上清。
2. 加 4.5 ml 的 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 4.5 ml Buffer S2，温和并充分地上下翻转 6-8 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 CO<sub>2</sub> 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 4.5 ml 4°C 预冷的 Buffer S3K，温和并充分地上下翻转 10 次混合均匀，直至形成紧实的凝集块；室温放置 5 min。  
\* 加入 Buffer S3K 后应立即混合，以避免形成局部的凝集块。  
\* 避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。
5. 加 4.5 ml 4°C 预冷的 Buffer B，温和并充分地上下翻转 10 次混合均匀， $\geq 6,000 \times g$  离心（4°C）10 min。
6. 正确连接负压装置，将中量制备管插到负压装置的插口上。
7. 吸取步骤 5 中的混合液，转移到中量滤器中，插入注射器芯，垂直向下缓慢推注至中量制备管中，开启并调节负压至-25-30 英寸汞柱，缓慢吸走管中溶液。
8. 保持负压，加 7 ml Buffer W1，吸尽管中溶液。
9. 加 8 ml Buffer W2，吸尽管中溶液。  
\* 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

10. 用塑料扳手取下中量制备管下部含质粒的制备管管头，置于洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，加 0.3 ml Buffer W2， $12,000\times g$  离心 2 min。
11. 将制备管管头置于另一洁净的 1.5 ml 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管的膜中央加 0.3 ml Eluent 或去离子水。室温静置 1 min。 $12,000\times g$  离心 1 min 收集质粒 DNA。  
\* 将 Eluent 或去离子水加热至  $65^{\circ}\text{C}$  将提高洗脱效率。
12. 可选步骤：同样方法，在制备管的膜中央加 0.2 ml Eluent 或去离子水，室温静置 1 min。 $12,000\times g$  离心 1 min 收集质粒 DNA。

## 五、流程图

加 4.5 ml Buffer S1  
加 4.5 ml Buffer S2  
加 4.5 ml Buffer S3K



裂解  
中和

加 4.5 ml Buffer B,  
离心  $6,000\times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ), 10 min



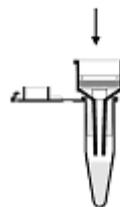
过滤

加 7 ml Buffer W1  
加 8 ml Buffer W2  
加 0.3 ml Buffer W2,  
离心  $12,000\times g$ , 2 min



结合  
洗涤

加 0.3 ml Eluent 或去离子水  
可选步骤：  
再加 0.2 ml Eluent 或去离子水



洗脱

## 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	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）。
		2) Buffer S2 过期	Buffer S2 中的 NaOH 易被空气中的 CO <sub>2</sub> 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 预热以及增加洗脱前静置时间至 5min 都可提高洗脱效率。	
<b>DNA 纯度低</b> 高纯度的质粒 A <sub>260/280</sub> 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。	<b>1. A<sub>260/280</sub> 比值过低</b> 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 S3K 后中和不完全			
<b>2. A<sub>260/280</sub> 比值过高</b> 表现为电泳时会出现 RNA 条带	<b>1) Buffer S1 中未加入 RNase A</b> <b>2) Buffer S1 保存不当，或者已经过期，RNase A 活性下降</b> <b>3) 菌量过多</b> <b>4) 加入 Buffer S1 后菌体没有完全悬起</b> <b>5) 加入 Buffer S2 后裂解不完全</b>	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																		
<b>琼脂糖凝胶中质粒条带模糊</b> 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	<b>1. 使用 endA+ 宿主菌</b> 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="400 476 951 864"> <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 EndA+)</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 EndA+)	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 EndA+)																			
HB101	Q358																			
JM83	RR1																			
JM101	TB1																			
JM110	TG1																			
LE392	Y1088 (Y10 系列宿主菌都是 End A+)																			
	<b>2. 菌培养时间过长</b> <b>3. 存放/处理收集菌时间过长</b> <b>4. 存放收集菌的方式不对</b> <b>5. 加入 Buffer S2 后裂解不完全</b> <b>6. 加入 Buffer S3K 后中和不完全</b>	不要超过 16 小时 存放 3 个月以内 请于-20℃以下存放																		
<b>琼脂糖凝胶电泳出现多个条带</b>	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
<b>琼脂糖凝胶电泳背景底色亮</b> 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"> <li>1. 培养时间过长，大量细菌死亡和产生大量菌体碎片</li> <li>2. 收集的细菌保存/处理时间过长</li> <li>3. 保存收集细菌的方法不对</li> <li>4. 菌量过多</li> <li>5. 加入Buffer S2后裂解不完全</li> <li>6. 加入 Buffer S3K 后中和不完全</li> </ol>	
<b>基因组 DNA 污染</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 培养时间过长，大量细菌死亡和产生大量菌体碎片</li> <li>2. 菌量过多</li> <li>3. 加入Buffer S2后震荡剧烈/裂解不完全/作用时间太长</li> <li>4. 加入 Buffer S3K 后剧烈震荡/中和不完全</li> </ol>	
<b>RNA 污染</b> 少量的 RNA 污染对于一般实验来说是没有影响的。	参见“A <sub>260</sub> /280 比值过高”	
<b>DNA 酶切效果不好</b> 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"> <li>1. 盐污染</li> <li>2. 乙醇污染</li> <li>3. Buffer S2 作用时间过长</li> <li>4. 核酸酶污染引起的质粒降解</li> <li>5. 质粒序列缺失</li> </ol>	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。