

## 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-50	AP-MN-P-250	AP-MN-P-500
Kit size	50 preps	250 preps	500 preps
Miniprep column	50	250	500
2 ml Microfuge tube	50	250	500
1.5 ml Microfuge tube	50	250	—
RNase A	30 µl	150 µl	300 µl
Buffer S1	15 ml	75 ml	150 ml
Buffer S2	15 ml	75 ml	150 ml
Buffer S3	21 ml	105 ml	210 ml
Buffer W1	28 ml	145 ml	280 ml
Buffer W2 concentrate	24 ml	2×72 ml	2×120 ml
Eluent	5 ml	25 ml	50 ml
Protocol manual	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 使用后应立即盖紧瓶盖，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 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  Buffer W2， $12,000\times g$  离心 1 min，弃滤液；以同样的方法再用 700  $\mu\text{l}$  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 离心管中，在制备管膜中央加 60-80  $\mu\text{l}$  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  $65^{\circ}\text{C}$  将提高洗脱效率。

## 五、流程图

加 250  $\mu\text{l}$  Buffer S1

加 250  $\mu\text{l}$  Buffer S2

加 350  $\mu\text{l}$  Buffer S3

裂解  
中和

加 500  $\mu\text{l}$  Buffer W1

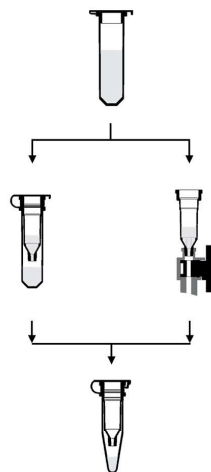
加 700  $\mu\text{l}$  Buffer W2

加 700  $\mu\text{l}$  Buffer W2

结合  
洗涤

加 60-80  $\mu\text{l}$  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 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 预热以及增加洗脱时间至 5min 都可提高洗脱效率。	
DNA 纯度低 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。	1. A <sub>260/280</sub> 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 <sub>260/280</sub> 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="406 533 946 913"> <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 +)																			
	<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 S3 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
<p><b>琼脂糖凝胶电泳背景底色亮</b></p> <p>细菌碎片、基因组和 RNA 污染都显现高亮电泳背景</p>	<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 S3 后中和不完全</li> </ol>	
<p><b>基因组 DNA 污染</b></p>	<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 S3 后剧烈震荡/中和不完全</li> </ol>	
<p><b>RNA 污染</b></p> <p>少量的 RNA 污染对于一般实验来说是没有影响的。</p>	<p>参见 “<b>A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值过高</b>”</p>	
<p><b>DNA 酶切效果不好</b></p> <p>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。</p>	<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>	<p>确保用 Buffer W2 洗涤 2 次。</p> <p>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。</p>