天净沙系列

CAT#:70903-100
CAT#:70903-15
常温运输及保存

TIANDZ

# 一步法质粒 DNAOUT

# One-Step Plasmid DNAOUT

## 使用手册 V3.5

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；电话：400-6765278；电邮：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。本产品的主要特点是:

1. 一步式裂解细菌，比传统的碱变性方法更快捷 20 分钟以上。
2. 产量跟经典碱变性法相当，产率一般为 3-5 ug 质粒 DNA/mL 饱和菌液（对高拷贝质粒而言）。
3. 所得质粒 DNA 呈超螺旋结构的比例比碱变性法更高。
4. 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。
5. 可以直接用于电泳、酶切、PCR、细菌转化、分子克隆、测序等实验。

## 规格及成分

| 成份 | 成份 | 小纸盒包装（15 次） | 大纸盒包装（100 次） |
|---|---|---|---|
| 溶液 A | 70903a | 10.5 mL | 70 mL |
| 离心吸附柱 | 60911 | 15 套 | 50 套×2 |
| 专用洗柱液 | 70903b | 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. 用塑料离心管收集不超过 3mL 过夜培养的饱和新鲜菌液，室温 12000-15000 g 离心半分钟，弃上清（培养基）。注意:不能超过 3 mL 菌液，否则质粒回收率将急剧降低。必须使用新鲜菌液，不能使用冻存的细菌沉淀和静置的细菌培养液。
2. 加入 0.7 mL 溶液 A，充分吹打或振荡裂解细菌直到裂解变澄清，一般需要半分钟左右。注:此方法不同于碱裂解法，此步需要充分吹打，使基因组 DNA 断裂。
3. 将裂解液全部转移到离心吸附柱中，不需要静置，直接进入下一步。
4. 室温 14000-15000 rpm 离心 2-5 分钟，弃穿透液。一般菌液越多需要离心的时间就越长。如果还有少量液体不能离心过柱，还可以延长离心时间直到所有液体成功过柱。如果离心速度低于 14000rpm，需要的离心时间会更长。需要注意有的离心机标注的离心速度跟实际的速度不符合，这种情况下，可以使用离心机的最大离心速度离心。
5. 在离心吸附柱中加入 0.7 mL 的专用洗柱液，室温 12000rpm 离心半分钟，弃穿

透液。

6. 再在离心吸附柱中加入 0.3 mL 的专用洗柱液，室温 12000rpm 离心半分钟，弃穿透液。
7. 室温 12000rpm 离心半分钟，甩干残留液体。**注意：此步不能省略，否则残留乙醇会影响后续的电泳上样（DNA 沉不到加样孔里去）和酶反应。**
8. 将离心柱置于一个新的 1.5 mL 自备塑料离心管中，加入 30-100 uL DNA 洗脱液 2.0。
9. 室温 12000-15000 g 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（酶切、电泳和测序）或放冰箱长期保存。

注意：此方法没有使用剧烈的碱变性，质粒 DNA 收到的伤害小，因此所得的质粒呈现天然的超螺旋结构的比例较大，这使得酶切效率比非超螺旋质粒稍低，但常规的 1 小时酶切一般都足够将超螺旋质粒切开。

此外，此方法没有使用可以降解 RNA 的 NaOH（常规碱变性质粒使用了 NaOH），所用溶液虽然含有 RNase，但由于整个操作非常快速，RNase 都来不及把细菌的内源 RNA 彻底降解，所以得到的质粒 DNA 往往有少量 RNA 的污染，这些污染会让 OD 值虚高，因此不建议使用测 OD 的方法确定 DNA 的浓度，最好采用电泳的方法跟浓度已知的 DNA marker 比较来确定浓度。残留的 RNA 污染一般不影响电泳、酶切和测序。如果需要彻底去除 RNA 污染，则需要在每次加入专用洗柱液后，室温放置 2-5 分钟，让其含有的 RNase 充分降解结合在膜上的 RNA，离心时降解成小片段的 RNA 就穿透到收集管，结合在膜上的 DNA 就更纯净。

## 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 | 增加抗菌素的用量 |
| | 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 |
| **OD260/280 不到 1.8** | 细菌量过多 | 勿使用超过 3mL 的饱和菌液 |
| | 蛋白质污染 | 可以用通用预洗液洗三次 |

| | |
|---|---|
| **背景资料** | **质粒 DNA 纯化技术简述**<br>碱裂解法质粒 DNA 纯化技术是 1979 年由 Birnboim & Doly 发明、现在仍然被广泛采用的经典技术。其第一步是细菌重悬。重悬液成份是 25 mM Tris-Cl(pH 8.0)、50 mM 葡萄糖和 10 mM EDTA。其中 Tris-Cl 用于缓冲 pH 以稳定 DNA 结构；葡萄糖用于保持渗透压和缓冲 pH，防止基因组 DNA 过度断裂；EDTA 用于螯合二价金属离子，使细胞更易破碎，也使 DNase 失活，有利于保持质粒 DNA 的完整性。第二步是碱裂解。碱裂解液的成分是 1% SDS 和 0.2 M NaOH。SDS 和 NaOH 的第一个作用是使细胞裂解释放菌体内容物。NaOH 的第二个作用是使体系的 pH 保持在 12.0-12.5 之间,在此 pH 范围内,基因组 DNA 不可逆变性而质粒 DNA 由于有特有的拓扑超螺旋结构，只发生可逆变性,可以在下一步中和过程中自然复性；SDS 的第二个作用是溶解蛋白质（平均两个氨基酸上结合一个 SDS 分子）和脂肪。第三步是中和。中和液的成份是 3 M 醋酸钾 / 2 M 醋酸。它一方面中和 NaOH，使质粒 DNA 复性而基因组 DNA 仍然保持单链状态；另一方面提高体系中的盐浓度，使蛋白质、基因组 DNA 和 RNA 发生盐析沉淀；此外加入的钾与 SDS 反应生成不溶的十二烷基硫酸钾（PDS），PDS 还与蛋白质和基因组 DNA 共沉淀。所以中和反应后，大部分蛋白质、基因组 DNA 和 RNA 都以不溶物状态存在，而大部分的质粒 DNA 由于分子量较小，不形成任何沉淀，而是以溶液状态存在。第四步是离心。离心过程使第三步形成的所有不溶物沉淀到管底，上清为质粒 DNA 粗提液，可以直接用于各种质粒精提方法进行进一步的纯化处理。碱裂解法的最大优点是技术成熟，可以处理从 1mL 到 500mL 或更多的样品，既适合于小规模的科研使用，又能用于工业级大规模生产临床用的质粒 DNA，并且适用于大肠杆菌的所有菌株。其主要缺点是操作难以控制，主要原因是使基因组 DNA 发生不可逆变性而环状质粒 DNA 发生可逆变性的 pH 范围十分狭小（在 12-12.5 之间）。pH 太低或太高都会影响质粒 DNA 的产量或质量。另一缺点是大规模处理时不容易去除 RNA 污染，尤其是在大规模纯化时，因为使用 RNase 成本很高，同时容易引入动物源性的病原。第三个缺点是步骤多，质粒 DNA 损失多，最终回收率只有 50-70%左右。最近德国 Eppendorf 公司推出了一种基于溶菌酶裂解细菌的一步式质粒 DNA 纯化产品 FastPlasmid Mini，与天泽基因的一步式质粒 DNA 纯化产品相比，操作过程十分相似，最大的不同是天泽基因的产品不需要使用动物源性的溶菌酶和 RNase，更适用于工业级大规模质粒 DNA 纯化。其次，天泽基因产品使用化学法裂解细菌，效果比 Eppendorf 的基于溶菌酶的温和裂解方法效果更好，对内源 DNase 的抑制更彻底，能有效防止其对质粒 DNA 的破坏。 |