Shanghai Promega Biological Products Ltd

# 技术手册

## Eastep™ 质粒小提试剂盒

## (Eastep™ Minipreps DNA Purification Kit)

产品目录：LS1010/LS1012

# 目录

1．介绍 ..... 1

2．产品组成及贮存条件 ..... 1

3．操作方法 ..... 3

3.1 大肠杆菌的制备 ..... 3

3.2 大肠杆菌的裂解 ..... 4

3.3 质粒 DNA 的分离及纯化操作方法 ..... 4

3.3.1 离心法分离及纯化 DNA ..... 4

3.3.2 真空法分离及纯化 DNA ..... 5

4．补充信息 ..... 6

4.1 质粒及 *E. coli* 菌株的选择及制备 ..... 6

4.2 挑选菌株 ..... 6

4.3 碱性蛋白酶的使用 ..... 7

4.4 用于自动荧光测序时的有关注意事项 ..... 8

5．常见问题答疑 ..... 9

6．缓冲液及溶液的配方 ..... 11

参考文献 ..... 11

## 1．介绍

Eastep™质粒小提试剂盒为快速分离质粒DNA提供了简单可靠的方法。整个操作过程所用时间取决于处理样品的数量，一般在30 分钟或更短的时间内即可完成。该系统用于分离*E.Coli* 中的各种质粒，且当质粒小于20,000bp 时最有效。纯化的质粒不需要后续处理即可用于DNA 荧光自动测序及其它标准的分子生物学操作。当用于体外转录实验时，需配合使用核糖核酸酶抑制剂，如：重组RNasin® 核糖核酸酶抑制剂(目录号：N2511)。

本手册提供的方法适用于从*E.coli* 中分离纯化质粒DNA。使用Eastep™质粒小提试剂盒，可以从1-10ml 过夜培养的*E.coli* 中纯化质粒DNA。许多因素会影响质粒的产量，包括细菌培养液的体积，质粒的拷贝数，培养基的种类及所使用的菌株。**图1** 是使用Eastep™质粒小提试剂盒分离及纯化质粒DNA的示意图。

## 2．产品组成及贮存条件

| **产品** | **规格** | **目录号** |
|---|---|---|
| Eastep™质粒小提试剂盒 | 50 次 | LS1010 |
| 仅供科研用途 | | |
| **组份：** | | |
| 碱性蛋白酶溶液 | 550μl | PP101A |
| 细胞悬浮液 | 20ml | PP202A |
| 细胞裂解液 | 20ml | PP203A |
| 中和溶液 | 30ml | PP204A |
| 柱清洗液 | 20ml | PP201A |
| 无核酸酶水 | 13ml | SP119A |
| 微量纯化柱 | 1 包(50 个/包) | PP301A |
| 收集管 | 1 包(50 个/包) | SR301B |

| **产品** | **规格** | **目录号** |
|---|---|---|
| Eastep™质粒小提试剂盒 | 250 次 | LS1012 |
| 仅供科研用途 | | |
| **组份：** | | |
| 碱性蛋白酶溶液 | 3ml | PP101B |
| 细胞悬浮液 | 75ml | PP202B |
| 细胞裂解液 | 75ml | PP203B |
| 中和溶液 | 100ml | PP204B |
| 柱清洗液 | 100ml | PP201B |
| 无核酸酶水 | 25ml | SP119D |
| 微量纯化柱 | 1 包(250 个/包) | PP301B |
| 收集管 | 1 包(250 个/包) | SR301C |

**注意：**产品LS1010和LS1012试剂盒内不含真空连接头。如需用真空法纯化质粒DNA，需另行购买真空连接头（目录号：A1331）。

**储存及稳定性：**所有组分保存在15-30℃环境中。试剂的有效期见产品标签。

质粒分离及纯化流程：

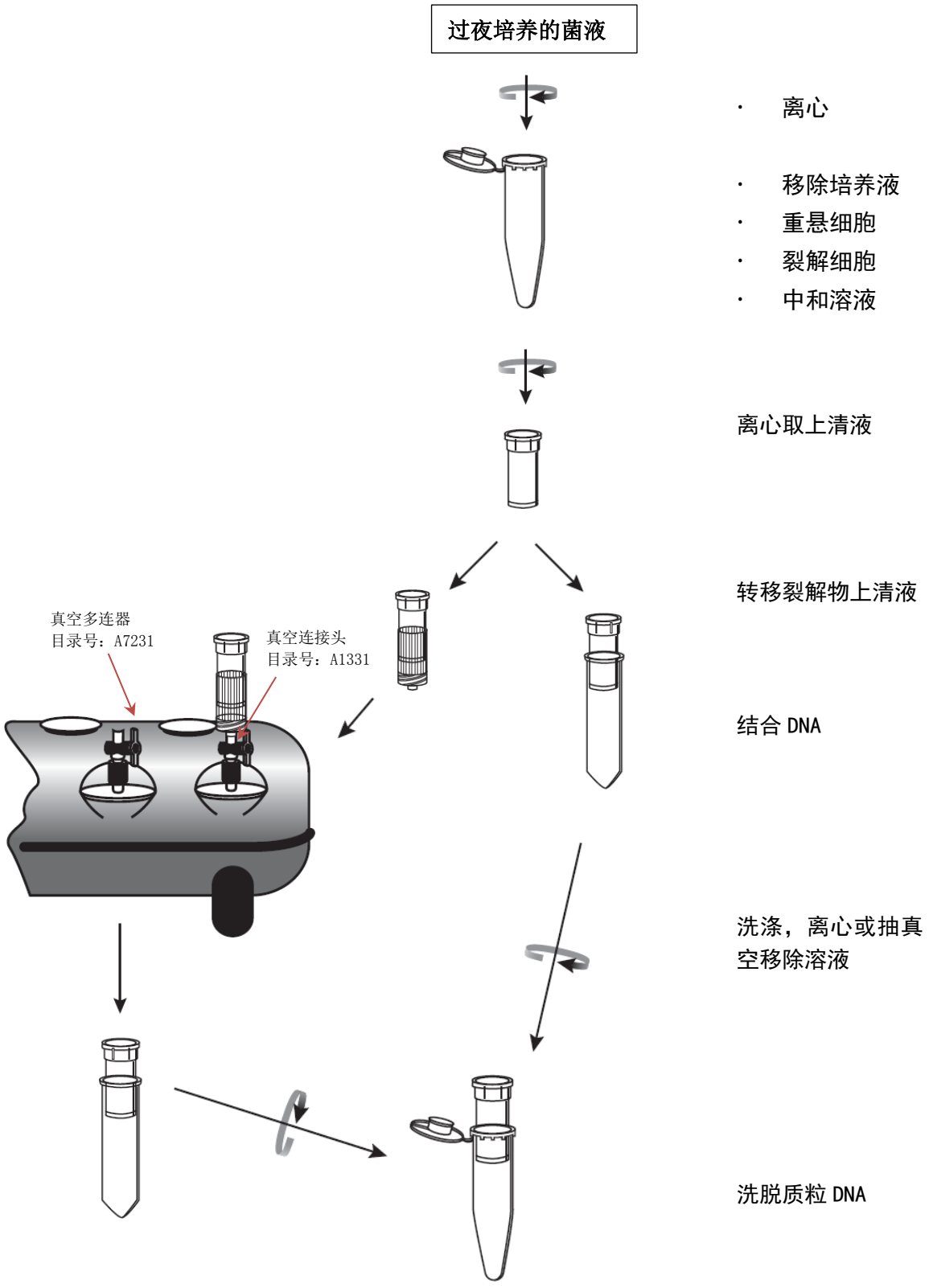



**图 1. Eastep™ 质粒小提试剂盒分离及纯化质粒 DNA 的流程图**

## 3．操作方法

**用户需要准备的材料（溶液配制见第6章节）**

- 含抗生素的LB琼脂平板
- 含抗生素的LB培养液
- 95%乙醇
- 小型离心机
- 1.5ml 无菌离心管

**在开始试验之前，请按照下表所示将95%乙醇（使用者自己准备）加到柱清洗液试剂瓶中，并在瓶上标明已加入乙醇。每次使用后务必盖紧瓶盖以防止挥发。**

| 规格 | 柱清洗液（产品编号） | 需加入的95%乙醇的体积 |
|---|---|---|
| 50次 | PP201A | 35ml |
| 250次 | PP201B | 170ml |

### 3.1 大肠杆菌的制备

1、从新鲜LB琼脂平板（含抗生素）上挑出单个菌落接种于1-10ml 相同的LB培养液中（含相同的抗生素），于37℃摇床培养过液（12-16小时）。

我们推荐使用LB培养液。富含营养的培养液，如Terrific Broth,会导致细菌浓度过高而使DNA纯化系统超载。

**注意：**

- 对于确定体积的培养液，可以进一步优化培养的时间，以提高质粒DNA的产量。但如果培养时间过长，培养液中的细胞发生死亡及裂解，也可能会导致质粒DNA产量下降。
- 对于高拷贝数的质粒，我们推荐过夜菌的体积不要超过5ml,否则会超出微量纯化柱的载量，且不会增加质粒DNA的产量。
- 对于低拷贝数的质粒，有必要增加处理细菌培养物的体积，最多到10ml，以得到足够的质粒DNA。如果处理量超过10ml，则可能会导致细菌无法充分裂解，并因此造成质粒DNA的污染。

2、测吸光度，当A600达到2.0-4.0时，收集细菌。此时细菌已达到分离纯化DNA的密度。

### 3.2 大肠杆菌的裂解

1. 将1-5ml (高拷贝数的质粒)或10ml（低拷贝数的质粒）的细菌培养物于10,000×*g* 离心5分钟。弃去上清液并将试管倒置于无菌滤纸上吸去剩余培养液。

2. 加入250µl细胞悬浮液，震荡或吹打以充分混匀细胞。**充分混匀细胞非常关键**。如果悬浮的细胞不在离心管中，则将其转移至1.5ml无菌离心管中。

**注意：以下操作步骤不要震荡以避免切断染色体DNA。**

3. 加入250µl细胞裂解液，颠倒离心管4次以充分混匀（**不要震荡**）。室温孵育细胞悬浮液至澄清，孵育时间大约需要1-5分钟。

**注意：**在加入碱性蛋白酶溶液（第4步）之前观察裂解液是否变为澄清非常重要。**但孵育时间不要超过5分钟。**

4. 加入10µl 碱性蛋白酶溶液并颠倒离心管4次以充分混匀。于室温孵育5分钟。

碱性蛋白酶能够灭活核酸酶及其它在细菌裂解过程中释放出的能够影响分离质粒质量的蛋白。**碱性蛋白酶孵育时间不要超过5分钟，**否则质粒DNA会出现缺口。

5. 加入350µl 中和溶液并迅速颠倒离心管4 次以充分混匀（**不要震荡**）。

6. 于室温将细胞裂解液以最大速度（约14,000×*g*）离心10 分钟。取澄清裂解液进行以下步骤的质粒DNA的分离及纯化。

### 3.3 质粒 DNA 的分离及纯化操作方法

质粒DNA的分离及纯化可以采用离心法或真空法。用真空法进行质粒DNA的分离纯化需另行购买真空连接头（目录号：A1331）。

#### 3.3.1 离心法分离及纯化 DNA

准备好微量纯化柱和收集管。一个样品需要一个微量纯化柱和一个收集管，将微量纯化柱插入收集管中。

1、用移液枪将澄清裂解液（大约850µl）转移到准备好的微量纯化柱中，避免碰到沉淀物。

注意：如果转移过程中不小心带入了白色沉淀物，需将微量纯化柱中的内含物重新转移到一个无菌1.5ml离心管中并以最大速度离心5-10分钟。再将离心后的上清液转移至先前使用的微量纯化柱中。微量纯化柱可以重复使用，但仅限于同一样品。

2、于室温，14000×g 离心1分钟，将微量纯化柱从收集管上移开，弃去收集管中的液体后重新装回到收集管上。

3、 加入750µl柱清洗液（已加95%乙醇）。

4、 于室温，14000×g 离心1分钟，清空收集管。

5、 加入250µl柱清洗液重复清洗步聚（已加95%乙醇）。

6、 于室温，14000×g 离心2分钟。

7、从收集管上取下微量纯化柱并转移至无菌1.5ml离心管中。操作时需小心，在转移微量纯化柱到离心管中时切勿带入清洗液。如果微量纯化柱上粘有柱清洗液，则需要重新以最大速度离心1 分钟，以甩掉柱清洗液后再转移到离心管中。

8、加入100µl无核酸酶水，于室温，14000×g离心1分钟。

9、不加缓冲液的DNA水溶液保存在—20℃或更低的温度下是稳定的。如果需要将DNA保存于TE缓冲液中，则在100µlDNA中加入11µl 10×TE缓冲液，加了TE缓冲液中的DNA保存在4℃是稳定的。

**注意：**如果DNA是用于自动荧光测序的，则不要向DNA 中加入TE 缓冲液。

### 3.3.2 真空法分离及纯化 DNA

将LuerLok®的真空连接头（目录号：A1331）与真空多连器（例如：Vac-Man®，目录号：A7231）的一个出口相连。轻轻地将微量纯化柱插入真空连接头并与真空连接头内壁紧密贴合。

1、用移液枪将澄清裂解液（大约850µl）转移到准备好的微量纯化柱中，避免碰到沉淀物。

**注意：**如果转移过程中不小心带入了白色沉淀物，需将微量纯化柱中的内含物重新转移到一个无菌1.5ml离心管中并以最大速度离心5-10分钟。再将离心后的上清液转移至先前使用的微量纯化柱中。微量纯化柱可以重复使用，但仅限于同一样品。

2、打开真空阀门（真空压力至少要达到15英寸汞柱），待液体全部通过微量纯化柱后释放真空压力。

3、加入750µl（已加95%乙醇）柱清洗液，待柱清洗液全部通过微量纯化柱后释放真空压力。

4、再加入250µl柱清洗液，待所有液体全部通过微量纯化柱后继续使用真空10分钟以吸干

微量纯化柱。

5、关闭真空，并将微量纯化柱转移到收集管中，以最大速度离心2 分钟以除去残留在微量纯化柱上的柱清洗液。

6、将微量纯化柱转移到1.5ml无菌离心管中。

7、加入100µl无核酸酶水，于室温，14000×g离心1分钟。

8、不加缓冲液的DNA水溶液保存在—20℃或更低的温度下是稳定的。如果需要将DNA保存于TE缓冲液中，则在100µlDNA中加入11µl 10×TE缓冲液，加了TE缓冲液中的DNA保存在4℃是稳定的。

**注意：**如果DNA是用于自动荧光测序，不要向DNA 中加入TE 缓冲液

## 4．补充信息

### 4.1 质粒及 *E. coli* 菌株的选择及制备

利用Eastep™质粒小提试剂盒可以从过夜培养的*E.coli*中纯化质粒DNA。质粒的产量与许多因素有关，包括质粒的拷贝数，细菌培养的密度，培养基的种类及所使用的菌株。

质粒的拷贝数是影响质粒DNA产量的重要因素。质粒的拷贝数主要取决于质粒上的复制起始位点(Origin of Replication)及其附近的DNA序列。细菌内的酶复合体（Enzyme Complexes）作用于这段DNA序列，即复制子（Replicon），从而调控质粒DNA的复制。有的DNA序列插入到特定质粒中时，能够干扰质粒的复制，从而降低质粒的拷贝数。

从新鲜的LB琼脂平板（含抗生素）上挑出单个菌落接种于1-10ml LB 培养液（含相同抗生素）进行培养。培养物应于37℃摇床中培养过夜（12-16 小时）。对于高拷贝数的质粒而言，当A600达到2.0-4.0时，细菌就达到了适于收获并分离DNA 的生长密度。

### 4.2 挑选菌株

核酸内切酶I 是一种12k Da 的胞周蛋白，它可以降解双链DNA。该蛋白有*endA* 基因编码。基因型为*endA*1 的*E. coli* 是野生型*endA* 基因中引入的一个突变，导致其产生没有活性的内切酶。具有这种突变的*E.coli* 被命名为EndA$^-$。表1 是EndA$^-$和EndA$^+$ *E. Coli* 菌株的列表。

如果*E.coli* 菌株的基因型中缺少*endA*1（或*endA*）则意味着存在野生型基因，它表达具有活性的核酸内切酶I。野生型表示为EndA$^+$。利用Eastep$^{TM}$质粒小提试剂盒可以轻易地从EndA$^-$和EndA$^+$ *E.coli* 菌株中获得高质量的DNA。但是EndA$^+$ *E. coli* 菌株对于许多应用都存在问题。一般而言，我们推荐尽可能使用EndA$^-$菌株，特别是对于诸如自动荧光测序一类的应用。

对于诸如自动荧光测序一类的应用，应特别注意选择质粒及菌株以优化产量及质粒质量。若要得到最佳的荧光DNA 测序结果，质粒扩增时应使用高拷贝数质粒及EndA$^-$菌株。

表**1. EndA$^-$**和**EndA$^+$ *E. coli*** 菌株

| **EndA$^-$** | **EndA$^+$** |
|---|---|
| BJ5183 | BL21(DE3) |
| DH1 | CJ236 |
| DH20 | HB101 |
| DH21 | JM83 |
| DH5α$^{TM}$ | JM101 |
| JM103 | JM110 |
| JM105 | LE392 |
| JM106 | MC1061 |
| JM107 | NM522（所有的NM 系列菌株均为EndA$^+$） |
| JM108 | NM554 |
| JM109 | P2392 |
| MM294 | PR700（所有的PR 系列菌株均为EndA$^+$） |
| SK1590 | Q358 |
| SK1592 | RR1 |
| SK2267 | TB1 |
| SRB | TG1 |
| TOP10 | Y1088（所有的Y10 系列菌株均为EndA$^+$） |
| XL1-Blue | BMH 71-18 |
| XLO | ES1301 |

### 4.3 碱性蛋白酶的使用

为了提高从EndA$^-$和EndA$^+$ *E.coli* 菌株分离的质粒DNA质量，Eastep$^{TM}$质粒小提试剂盒包含了碱性蛋白酶溶液。碱性蛋白酶，最初被命名为*Subtilisin carlsberg*，是从*Bacillus licheniformis* 细菌中分离到的[1]。在制备澄清细菌裂解液以灭活核酸内切酶的过程中，于裂解步骤的最后向每个样品中加入大约250µg 碱性蛋白酶。碱性蛋白酶也可以非特异性地降解蛋白，这样就降低了澄清细菌裂解液中蛋白污染的整体水平[2][3]。

碱性蛋白酶在本步骤中非常有用，因为它的最适pH为9或以上，能够在裂解步骤的环境中保持活性。当裂解液被中和后，碱性蛋白酶活性也随着降低[4][5]。

由本方法制备的质粒DNA的质量已通过广泛的分子生物学实验得到验证，包括荧光测序，内切酶消化及分子克隆。

### 4.4 用于自动荧光测序时的有关注意事项

对于自动荧光测序应用，应特别注意选择质粒种类及大肠杆菌菌株以优化产量及质粒质量。

**注意：**为了得到最佳的自动荧光测序结果，一般使用高拷贝数质粒及EndA$^-$ *E.coli*. 菌株。

纯化的质粒DNA 必须在适于自动循环测序的浓度范围内（理想浓度为0.2μg/μl 且不要低于0.1μg/μl）。当操作低拷贝质粒时，我们强烈推荐：在提取之前，用琼脂糖凝胶/溴化乙锭方法确定质粒DNA的浓度[6]。用分光光度计对DNA 定量容易导致误差而且需要大量的样品。

当使用pGEM® 载体及DH5α™细胞时，Eastep™质粒小提试剂盒能从1.5 ml过夜菌中获得3.5-5.0μg 的质粒DNA。对于低拷贝数质粒（如pALTER® -1），需要较大体积的菌液（10 ml）以得到足够用于测序的DNA。典型低拷贝数质粒DNA 产量为1.5-3.0μg。

使用**BigDye®**试剂测序时应特别注意的事项：

用Eastep™质粒小提试剂盒纯化的模板适用于许多荧光染色测序方法，包括 ABI PRISM® BigDye® 末端终止反应（Perkin-Elmer 目录号：4303149，4303150，4303151）。

当稀释BigDye® 终止反应混合物时必须使用合适的稀释缓冲液（250mM Tris-HCl [pH 9.0]，10mM $MgCl_2$）。当使用高拷贝数质粒且将终止反应混合物稀释6 倍时，可以得到超过500碱基的可读序列。

表2 概括了为得到BigDye® 终止反应混合物的合适稀释度而需要的终止反应混合物和稀释缓冲液的量。如需了解这些反应的详细信息，请参考BigDye® 末端终止系统提供的操作手册。对于每一个反应，应将表2中的试剂加入到单独的试管中。

**表2. BigDye®末端终止反应的合适稀释度**

| 组分 | 用量 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 不稀释 | 1:2稀释 | 1:4稀释 | 1:6稀释 |
| 终止反应混合物* | 8.0μl | 4.0μl | 2.0μl | 1.3μl |
| 双链质粒DNA模板 | 200-500ng | 200-500ng | 200-500ng | 200-500ng |
| 引物 | 3.2pmol | 3.2pmol | 3.2pmol | 3.2pmol |
| 稀释缓冲液** | 0μl | 2.0μl | 3.0μl | 3.4μl |
| 加入无核酸酶水后的终体积 | 20μl | 20μl | 20μl | 20μl |

*终止反应混合物是2.5×溶液。

**稀释缓冲液是5×溶液。

## 5．常见问题答疑

| 问题 | 可能原因 | 推荐办法 |
|---|---|---|
| 细胞裂解不充分 | 培养液中的细菌细胞太多。 | 使用$A_{600}$在2.0-4.0 的细菌培养液，所有培养液应含有抗生素。对于低或高拷贝数质粒使用推荐的培养体积（低拷贝数最多10ml，高拷贝数最多5ml）。 |
| | 沉淀的细菌细胞悬浮不好。 | 在裂解细胞前充分悬浮细胞。旋涡震荡或吹打细胞悬浮液。悬浮后应看不到细胞团块。 |
| 无纯化的质粒DNA | 柱清洗液中未加入酒精。 | 操作前按照**章节3**介绍的方法准备柱清洗液。 |
| | 质粒DNA 定量不准确。 | 使用琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳方法确定质粒DNA 的产量。 |
| | 在凝胶定量上样时DNA漂出加样孔。 | 最后一步清洗后，确保干燥10 分钟（真空方法），让剩余的酒精挥发掉；提高上样染料的浓度。 |
| | 使用了低拷贝数质粒。 | 使用高拷贝数质粒。 |
| 质粒DNA 产量低 | 细菌培养液中未转化。 | 确认所有的液体及固体培养基中均使用了抗生素。 |
| | 细胞过度生长，细菌培养时间过长。 | 从新鲜的过夜培养的平板上挑选一个克隆加入含有抗生素的培养基中。于37 ℃培养12-16小时。 |
| | 使用了低拷贝数质粒。 | 了解所使用质粒的拷贝数；我们推荐使用高拷贝数质粒。 |
| | 质粒DNA 定量不准确。 | 使用琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳方法确定质粒DNA 的产量。不要依赖分光光度计定量的准确性。 |
| 质粒DNA有缺口 | 碱水解过程中孵育时间过长。 | 当细胞悬浮液中加入细胞裂解液及碱性蛋白酶溶液孵育时，每一步不要超过5分钟。 |
| 自动荧光测序结果不好 | 测序反应时加入的DNA太少。 | 使用新挑选的*E. coli* 克隆并用新鲜的LB培养基进行培养。纯化质粒并用琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳方法确定质粒DNA 的产量。 |

| | | |
|---|---|---|
| | DNA洗脱时使用了TE缓冲液。 | 重新纯化质粒DNA 并用无核酸酶水洗脱DNA。 |
| | 质粒DNA的浓度定量不准确。 | 必须使用琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳方法确定质粒DNA 的产量。 |
| 内切酶无法消化染色体 | 提高内切酶的浓度，延长消化时间。 | 增加内切酶的用量或延长孵育时间。使用建议温度及适合所用内切酶的缓冲液进行消化。用乙醇沉淀质粒DNA以除去残留的盐。 |
| DNA污染 | 旋涡震荡或过度混合会造成染色体DNA污染使，用了错误的试剂。 | 样品中加入细胞裂解液后不要旋涡震荡以避免切断染色体DNA。<br>确认在使用前用95%乙醇稀释柱清洗液。 |
| 凝胶上的DNA产量看起来低于分光光度计的读数 | 洗脱的DNA中存在的痕量污染会导致分光光度计的读数升高。 | 用苯酚:氯仿抽提并用乙醇沉淀DNA，并在重复分光光度计读数前用70%乙醇清洗DNA沉淀。用琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳方法以得到最准确的定量结果。 |

## 6. 缓冲液及溶液的配方

**10×TE 缓冲液**

100mM Tris-HCl (PH 7.5)
10mM EDTA

**LB 培养基**

10g 酪蛋白胨
5g 酵母提取物
5g NaCl
15g 琼脂（仅用于平板LB培养基）

溶解于1L 双蒸水中。高压灭菌并冷却到55℃后加入抗生素。

**5×稀释缓冲液**

250mM Tris-HCl (PH 9.0)
10mM MgCl2

## 参考文献

1. Guntelberg, A.V. and Otteson, M. (1954) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **29**, 36.
2. Aehle, W. *et al*. (1993) Rational protein engineering and industrial application:Structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved'washing performance'-the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus. J. Biotechnol.* **28,** 31.
3. Van der Osten, C. *et al*. (1993) Protein engineering of subtilisins to improve stability in detergent formulations. *J. Biotechnol.* **28,** 55.
4. Vetter, R. *et al.* (1994) Highly alkaline proteases. U.S. Pat. No. 5,352,603. (October 4,1994).
5. Shetty, J. K., Patel, C. P. and Nicholson, M. A. (1995) Method of preparation of purified alkaline proteases. U.S. Pat. No.5,439,817. (August 8, 1995).
6. Kahn, M. *et al.* (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmids *Co/E1,* F, R6K,and RK2. *Meth. Enzymol.* **68,** 268.