



StarPrep Fast Plasmid Mini Kit

StarPrep 快速质粒小提试剂盒

版本号: V230401

货号: D201

保存: 常温, 其中 RNase A 于 4°C 保存

运输: 常温, 其中 RNase A 于低温运输

| 货号 | 规格 |
|---------|---------|
| D201-01 | 50 rxn |
| D201-04 | 200 rxn |

【产品概述】

StarPrep 快速质粒小提试剂盒采用改良的碱裂解-中和法, 结合硅胶膜吸附技术, 使质粒 DNA 获得高效、专一的吸附。经过两步洗涤, 清除基因组 DNA、RNA、蛋白质及其他杂质, 被吸附的质粒 DNA 随后被低盐缓冲液从离心吸附柱上洗脱下来。本试剂盒适宜从常规克隆菌株中提取 20 kb 以下的质粒, 操作快速方便, 单个样品可在 25 min 内完成, 20 个样品只需 45 min 完成; 从 4 ml 过夜培养 (≤16 小时) 的菌液中通常可提取出 10-20 μg 的高拷贝质粒 DNA, 其中超螺旋结构占 90% 以上, 可直接用作荧光测序的模板, 以及 PCR、酶切、连接、转化、体外转录等常规分子生物学实验。

【产品组分】

| 组分货号 | 组分名称 | D201-01 | D201-04 | 注意事项 |
|--------|---------------------------------------|---------|---------|-------------------------------|
| ZD2000 | Buffer BL | 30 ml | 120 ml | 请使用当天用 Buffer BL 处理过的吸附柱 |
| ZD2001 | Buffer S1 | 15 ml | 60 ml | 初次使用前请按瓶标加入 RNase A, 于 4°C 保存 |
| ZD2002 | Buffer S2 | 15 ml | 60 ml | 用完立即盖紧瓶盖; 如有结晶析出, 可 37°C 水浴助溶 |
| ZD2003 | Buffer S3 | 20 ml | 80 ml | 有刺激性, 请勿直接接触皮肤 |
| ZD2006 | Buffer CWB | 20 ml | 40 ml×2 | 初次使用前请按瓶标说明加入 1.75 倍体积无水乙醇 |
| ZD2007 | Buffer EB | 5 ml | 20 ml | |
| ZD2008 | RNase A (10mg/ml) | 150 μl | 600 μl | 室温保存 12 个月 |
| ZD2200 | Spin Columns with Collection Tubes-CB | 50 套 | 200 套 | 常温密闭干燥保存 |
| ZD2009 | 1.5ml Centrifuge Tubes | 50 个 | 200 个 | 常温密闭干燥保存 |

【保存条件】

该试剂盒置于室温 (15-25°C) 干燥条件下, 可保存 24 个月。单独包装的 RNase A 在室温可稳定保存 12 个月, 更长时间保存可置于 4°C。将 RNase A 加入 Buffer S1 中, 于 4°C 保存, 可稳定保存 12 个月。

【实验准备】

1. 用户需自行准备的材料: 含适当抗生素的 LB 培养基, 无水乙醇, 台式离心机。
2. 初次使用本试剂盒, 请按瓶标说明向 Buffer S1 中加入 RNase A 溶液, 向 Buffer CWB 中加入无水乙醇 (用户自备), 并在试剂瓶上做标记。

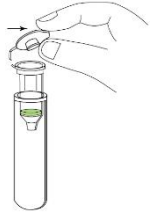
【操作步骤】

本实验方法适用于从 1-5 ml 过夜培养的大肠杆菌菌液中提取质粒。提取量受菌株、质粒拷贝数、菌液体积和培养时间、培养基类型等因素的综合影响。

1. **柱平衡:** 向离心吸附柱中加入 500 μl Buffer BL, 静置 1 min, 室温下 12,000 rpm 离心 1 min, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理过的吸附柱)
2. **收菌:** 取 1-5 ml 过夜培养的菌液 (37°C, 12-16 h) 加入无菌离心管中 (自备), 于室温 10,000 rpm 离心 1-2 min, 彻底弃除上清。
注: 菌液用量过大不能增加质粒产量, 反而会因裂解不全或杂质堵塞硅胶膜而降低产量; 培养时间不宜过长, 否则会增加开环结构质粒的比例。
3. **重悬:** 加入 250 μl 含 RNase A 的 Buffer S1, 充分混匀振荡或用枪头反复吹打使细菌彻底分散悬浮。
4. **裂解:** 加入 250 μl Buffer S2, 轻轻上下颠倒混合 5 次, 室温静置 1-5 min, 待细菌充分裂解, 溶液变半透明。
注: 避免剧烈振荡导致基因组 DNA 裂解; 裂解时间不能超过 5 min。
5. **中和:** 加入 350 μl Buffer S3, 轻轻上下颠倒混合 5 次, 充分混匀, 避免剧烈振荡。室温下 12,000 rpm 离心 10 min。



6. **DNA 结合:** 小心吸取上清, 转移到插入收集管的离心吸附柱内, 室温下 12,000 rpm 离心 1 min, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新插回收集管中。
7. **清洗:** 加入 500 μ l Buffer CWB (请确认已加入乙醇!) 于离心吸附柱中, 室温下 12,000 rpm 离心 30 s, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新插回收集管中。
8. **再次清洗:** 重复操作步骤 7 一次。将离心吸附柱去盖再次离心 2 min, (如图示方向您只需用手轻轻一拉, 管盖即会自然轻松脱落) 彻底除去残余漂洗液。
9. **洗脱:** 小心取出离心吸附柱, 将其套入一个 1.5ml Centrifuge Tubes。向硅胶吸附膜的中央加入 100 μ l Buffer EB, 室温放置 1 min 后, 12,000 rpm 离心 1 min 收集质粒 DNA。



注: 为提高质粒浓度, 最低可使用 30 μ l 的 Buffer EB, 离心收集后可将洗脱的质粒溶液再次加入离心吸附柱中重复洗脱; 使用 100 μ l Buffer EB 则无需二次洗脱; 对 6 kb 以上的质粒, 可使用预先加热至 55 $^{\circ}$ C Buffer EB 洗脱以提高产量; Buffer EB 不含 EDTA, 故不会影响荧光测序等后续反应; 如必须使用无菌去离子水洗脱, 需注意其 pH 值是否接近中性, 否则应使用 NaOH 溶液将 pH 值调节至 7.0-8.5 之间。

10. **储存:** 弃除离心吸附柱, 纯化的质粒可直接用于后续反应或于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

注: 经检测, 本试剂盒从 endA-菌株 (如 DH5 α , TOP10, XL-blue 等) 中提取的质粒反复冻融 20 次无降解; 如需在 4 $^{\circ}$ C 长期保存或者保存从 endA+菌株 (如 JM109, HB101, BL21 等) 中提取的质粒, 可向每 100 μ l 质粒溶液中加入 11 μ l 的 10 \times TE 溶液, 但含 EDTA 的质粒溶液不可用作荧光测序模板。

【质粒小提常见问题分析及解决方案】

| 问题 | 可能原因 | 解决方案 |
|------------|---------------------------------|---|
| 无质粒 | 未加抗生素或抗生素失效导致质粒丢失 | 确保培养基含有正确、有效的抗生素 |
| | 质粒拷贝数量低 | 提取低拷贝质粒需收集较多量菌液 (不超 10 ml) 或采用添加氯霉素方法促使质粒复制 |
| | Buffer CWB 中未添加乙醇 | 按照说明书指定方法添加乙醇并做标记后使用漂洗液 |
| 产量低 | 未使用 Buffer BL | 请按步骤使用 Buffer BL, Buffer BL 可改善吸附柱的吸附能力并提高吸附柱的均一性和稳定性, 提高 DNA 片段回收效率 |
| | 培养时间过短或过长 | 37 $^{\circ}$ C 孵育 12-16 h 后收集菌液; 培养时间过长可能导致菌体裂解, 质粒丢失 |
| | 质粒拷贝数量低 | 提取低拷贝质粒需收集较多量菌液 (不超 10 ml), 或采用添加氯霉素方法促使质粒复制 |
| | 洗脱溶液 pH 值不合适 | 使用试剂盒提供的 Buffer EB, 如用水洗脱, 需将 pH 值调至 7.0-8.5 范围; 对 6 kb 以上的质粒, 可将 Buffer EB 加热至 55 $^{\circ}$ C 有助于提高洗脱效率 |
| | 洗脱溶液体积过小 | 使用 30 μ l 以上的洗脱溶液, 加至硅胶膜的中央, 静置 1 min, 使膜完全浸润后再离心 |
| 测序结果不佳 | DNA 测序用量过低或过高 | 调整测序反应使用的 DNA 量。质粒浓度过低, 可通过乙醇沉淀浓缩产物; 浓度过高, 则需要稀释。定量方法应采用电泳染色检测定量 |
| 酶切效果不佳 | Buffer CWB 去除不彻底, 质粒中残留有乙醇或盐 | 开盖或真空处理, 使残留乙醇挥发; 漂洗液二次洗涤完毕后, 应再次离心 1-2 min, 以彻底去除残留乙醇 |
| 基因组 DNA 污染 | 裂解或中和步骤因剧烈振荡导致基因组 DNA 断裂 | 裂解和中和步骤应轻柔颠倒混合, 避免涡旋振荡 |
| RNA 污染 | Buffer S1 中未添加 RNase A 溶液或未低温保存 | 初次使用本试剂盒时应将试剂盒提供的 RNase A 溶液全部加入 Buffer S1 中, 使用后于 4 $^{\circ}$ C 保存该试剂; 可稳定保存 12 个月 |
| 质粒断裂 | 裂解时间过长导致质粒断裂 | 细胞裂解过程应控制在 5 min 以内 |

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下, 本公司对此产品所承担的责任, 仅限于此产品的价值本身。