



StarPrep Solution-based Plasmid Maxi Kit

StarPrep 溶液法质粒大提试剂盒

版本号: V221001

货号: D212

保存: 常温

运输: 常温

货号	规格
D212-01	10 rxn

【产品概述】

StarPrep 溶液法质粒大提试剂盒采用改良的碱裂解-中和法, 结合杂质清除剂, 经过两步洗涤, 清除基因组 DNA、RNA、蛋白质及其他杂质, 获得大量高纯度的质粒 DNA。本试剂盒适宜从常规克隆菌株中提取 20 kb 以下的质粒, 操作方便, 从 100 ml 过夜培养 (≤ 16 h) 的菌液中通常可提取出 500-1500 μ g 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	D212-01	注意事项
ZD2001	Buffer S1	100 ml	初次使用前请按瓶标说明加入 RNase A, 于 4°C 保存
ZD2002	Buffer S2	100 ml	用完立即盖紧瓶盖; 如有结晶析出, 可于 37°C 水浴加热助溶
ZD2208	Buffer M3	100 ml	有刺激性, 请勿直接接触皮肤
ZD2209	Buffer B1	100 ml	
ZD2210	Buffer B2	5 ml	
ZD2007	Buffer EB	20 ml	
ZD2008	RNase A (10mg/ml)	1 ml	室温保存 12 个月

【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: 含适当抗生素的培养基, 75%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 1 ml 的 RNase A, 并在试剂瓶上做标记。

【操作步骤】

本实验方法适用于从 100-200 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。高拷贝质粒推荐使用菌液量为 100 ml, 如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒, 应加大菌体量, 同时按比例增加 S1、S2、M3 和 B1 的用量。

1. **集菌:** 取 100 ml 过夜培养 (37°C, 12-16 h) 的菌液加入无菌离心管 (自备) 中, 于室温 10,000 rpm 离心 1-2 min, 彻底弃除上清。
注: 菌液用量过大不仅不能增加质粒产量, 反而会因裂解不全而降低产量; 培养时间不宜过长, 否则会增加开环结构质粒的比例。
2. **重悬:** 加入 10 ml 含 RNase A 的 Buffer S1, 充分混悬振荡或用枪头反复吹打使细菌彻底分散悬浮。
3. **裂解:** 加入 10 ml 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。
4. **中和:** 加入 10 ml Buffer M3, 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。
5. **沉淀:** 小心吸取上清转移到新 50 ml 无菌离心管 (自备) 中, 加 10 ml Buffer B1, 上下颠倒混匀, 室温下 12,000 rpm 离心 15 min。弃去上清。将管倒置在吸水纸上, 去除残液。
注: 吸取上清时, 尽量避免吸到杂质, 若有需要可二次离心。



6. **浓缩:** 加入 900 μ l Buffer EB, 震荡 30 s, 重悬质粒 DNA, 瞬时离心, 转移到 1.5 ml 离心管(自备)中, 加 300 μ l Buffer B2 (B2 加入量为 EB 体积的 1/3), 上下颠倒混匀, 室温下 12,000 rpm 离心 10 min, 弃去上清, 将管倒置在吸水纸上, 吸去残液。
7. **清洗:** 加入 1 ml 75%乙醇, 上下颠倒, 室温下 12,000 rpm 离心 5 min, 弃除上清, 将管倒置在吸水纸上吸去残液, 室温下正置开口放置 2 min 挥发残余乙醇。
8. **溶解:** 加 500 μ l Buffer EB 或去离子水溶解质粒 DNA。
注: 根据需要可酌情调整 Buffer EB 或去离子水的量。
9. **储存:** 纯化的质粒可直接用于后续反应或于 -20°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°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。

【常见问题分析及其解决方案】

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, 或采用添加氯霉素方法促使质粒复制
产量低	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
	培养时间过短或过长	37°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, 或采用添加氯霉素方法促使质粒复制
	菌体量少	推荐使用 TB 或 LB24 等培养基, 可富集更多菌体, 提高质粒得量
测序结果不佳	洗脱液 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, 可将洗脱缓冲液加热至 55°C 有助于提高洗脱效率
	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	TE 缓冲液干扰测序结果	使用无 DNA 酶污染的 Buffer EB 或灭菌双蒸水溶解 DNA 作为测序模板
	酶的质量低劣或使用方法不当	按照厂家说明书正确使用酶; 设立阳性对照检测内切酶活性
基因组 DNA 污染	乙醇去除不彻底, 质粒中残留有乙醇或盐	开盖或真空处理, 使残留乙醇挥发
	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 溶液全部加入细胞悬浮液中, 使用后于 4°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。