

8 min FastPure Plasmid Mini Kit

DC221



使用说明书

Version 24.1

Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	02
06/注意事项	03
07/实验原理与流程概要	03
08/实验流程	04
09/常见问题与解决方案	05

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

01/产品概述

本试剂盒适用于提取1 - 4 ml过夜培养的菌液，采用优化的碱裂解法裂解细胞，提高核酸释放效率，通过独特的硅基质膜吸附技术高效结合质粒并有效地去除蛋白、多糖等杂质获得高纯质粒DNA。添加指示剂的独特P2溶液，通过颜色的变化，指示裂解、中和是否充分，保证提取质量，实现可视化操作。提取的质粒DNA产量高且仅需8 min，纯化的质粒DNA可直接用于酶切、PCR、测序、连接、转化、转染一些常规的传代细胞等生物学实验。

02/产品组分

组 分	DC221-01 (150 rxns)	DC221-02 (300 rxns)
■ RNase A Solution	112.5 μ l	225 μ l
Buffer P1	22.5 ml	45 ml
Buffer P2	22.5 ml	45 ml
Buffer NP3	52.5 ml	105 ml
Buffer PW	24 ml	48 ml
Elution Buffer	15 ml	30 ml
FastPure DNA Mini Columns IV	150	2 \times 150
2 ml Collection Tubes	150	2 \times 150

RNase A Solution: 去除RNA;

Buffer P1: 悬浮细菌;

Buffer P2: 裂解细菌;

Buffer NP3: 中和;

Buffer PW: 去除蛋白、盐离子等杂质残留;

Elution Buffer: 洗脱质粒;

FastPure DNA Mini Columns IV: 吸附质粒;

2 ml Collection Tubes: 收集滤液。

03/保存条件

15 ~ 25°C保存，室温运输。

04/适用范围

本试剂盒适用于1 - 4 ml过夜培养的菌液。

05/自备材料

无水乙醇，2 ml无菌离心管，1.5 ml无菌离心管。

06/注意事项

1. 吸附柱15 ~ 25℃保存，长期保存建议置于2 ~ 8℃。
2. Buffer P1使用前请加入RNase A Solution (将试剂盒提供的RNase A Solution全部加入)，混匀后置于2 ~ 8℃保存，可稳定保存6个月。
3. 首次使用前按Buffer PW瓶身标签所示，加入相应体积的无水乙醇，混匀后使用。
4. Buffer P2、Buffer NP3低温(<20℃)易析出，使用前先检查是否有晶体析出，如有晶体析出，可置于37℃加热10 min至完全溶解，待恢复至室温，混匀后使用。
5. 处理低拷贝质粒或大片段质粒(>10 kb)时，可适当提高菌液投入量，并按推荐比例增加Buffer P1、Buffer P2和Buffer NP3的用量。洗脱缓冲液Elution Buffer推荐在65℃水浴中预热，并适当延长吸附和洗脱时间，以提高提取得率。
6. 质粒DNA的产量和质量与质粒拷贝数、宿主菌、培养基类型、抗生素等因素有关。
7. 注意不要直接接触Buffer P2、Buffer NP3，使用时应戴好乳胶手套，使用后应立即盖紧盖子，避免试剂被空气中中和，降低提取效果。
8. 所有离心步骤均在室温(15 ~ 25℃)下进行。

07/实验原理与流程概要

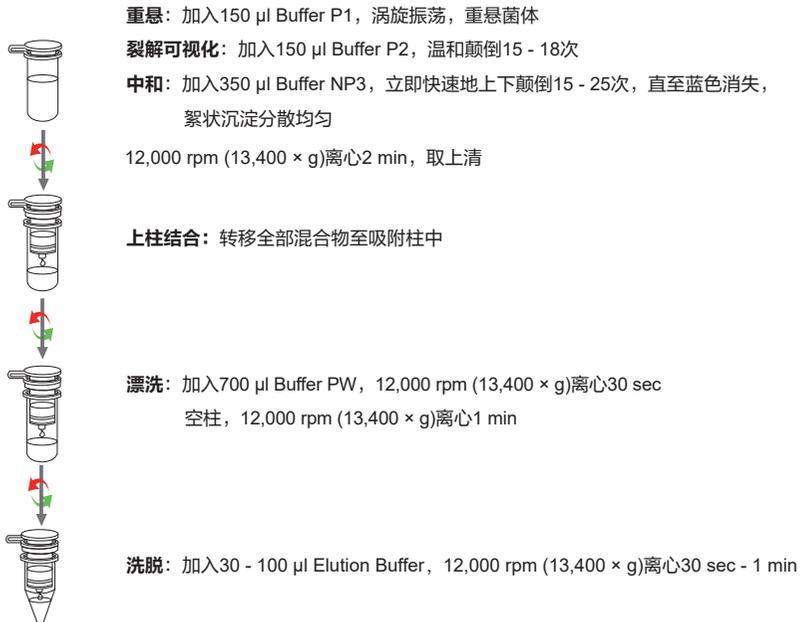


Fig 1. 8 min FastPure Plasmid Mini Kit提取流程

08/实验流程

1. 取1 - 4 ml (2 - 8 OD)过夜培养的菌液，12,000 rpm (13,400 × g)离心1 min收集菌体，尽量弃除干净上清。

▲ 菌体体积投入量与裂解液体积投入的推荐比例：

菌液最大投入量	P1投入量	P2投入量	NP3投入量
1 - 4 ml (2 - 8 OD)	150 μl	150 μl	350 μl
4 - 8 ml (8 - 16 OD)	250 μl	250 μl	350 μl

▲ 培养基残留过多将降低裂解液效果，需尽量弃除。

2. 加入150 μl Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A Solution)，使用移液器或涡旋混匀仪振荡至菌体完全重悬，重悬液应呈现均质分散状态，无明显菌体颗粒及团块。

▲ 菌体完全重悬后，应立即进行后续操作，否则会造成菌体成团，裂解不充分，影响提取性能。

3. 立即加入150 μl Buffer P2，温和地上下颠倒混匀15 - 18次，菌液应呈现蓝色清亮粘稠状态。

▲ 此步应温和混匀，不要剧烈振荡，避免基因组DNA污染。此时菌液应变得清亮粘稠，所用操作时间不应超过3 min，避免使质粒受到破坏。

▲ 注意使全部菌体被裂解液混合！

4. 加入350 μl Buffer NP3，立即快速地上下颠倒15 - 25次，直至蓝色彻底消失，此时应出现白色分散均匀的絮状沉淀，12,000 rpm (13,400 × g)离心2 min。

▲ 溶液由蓝色变为无色，表明中和完全，注意避免出现大量絮团沉淀，否则会影响提取产量和离心后移液操作。

▲ 离心后上清应为澄清状，若上清液面漂有微小白色沉淀，不影响后续操作。

5. 小心转移离心后的上清液至FastPure DNA Mini Columns IV吸附柱(放入2 ml Collection Tubes)中，12,000 rpm (13,400 × g)离心30 sec，弃滤液。

6. 加入700 μl Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇)至吸附柱中，12,000 rpm (13,400 × g)离心30 sec，弃滤液。

7. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm (13,400 × g)离心1 min，弃收集管。

▲ 若吸附柱有乙醇残留，将会影响下游实验，可短暂开盖晾干1 min。

8. 将吸附柱置于新的1.5 ml无菌离心管(自备)中，向吸附柱膜中央加入30 - 100 μl Elution Buffer。12,000 rpm (13,400 × g)离心30 sec - 1 min，弃吸附柱。

▲ 洗脱体积建议不少于30 μl，体积过小会降低洗脱效率。

▲ 若使用ddH₂O洗脱，应确保ddH₂O的pH在7.0 - 8.5范围内，pH低于7.0会降低洗脱效率。

▲ 将洗脱液于65℃预热或二次洗脱，可提高质粒的洗脱效率。为增加洗脱产量，可将离心液二次上柱洗脱。

9. 提取的质粒DNA于-30 ~ -15℃保存。

09/常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
质粒DNA 产量低	1. 低拷贝质粒	载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。处理低拷贝质粒(SuperCos、pWE15、pBR322、pACYC及其衍生载体、pSC101及其衍生载体等)或大片段质粒(>10 kb)时,建议适当提高菌液投入量,并按比例增加Buffer P1、Buffer P2和Buffer NP3的用量;预热洗脱液至65~70℃,且适当延长吸附和洗脱时间,以提高提取得率。
	2. 菌体中无质粒	确保筛选用的抗生素及工作浓度使用正确;不同种类质粒在不同宿主菌中的稳定性有差异,避免因多次迭代转接造成质粒丢失和损伤。甘油菌种保存过程中存在质粒丢失现象,建议培养细菌前先划线或涂布平板活化菌种,以稳定产量。
	3. 宿主菌株差异	不同宿主对质粒产量也会产生影响。建议使用end A ⁻ 大肠杆菌菌株,如DH5α、TOP10及XL10等。
	4. 裂解不充分	菌体投入量过大会导致裂解不充分质粒产量低,建议选择适当的菌液投入量和适配的溶液体积。
	5. 重悬不充分	重悬细菌对产量非常关键,确保菌体沉淀彻底悬浮至看不到细胞团块;成团的细菌因无法裂解会降低产量。
	6. 试剂准备有误	确保Buffer P1使用前已加入全部RNase A Solution。Buffer P2久置或低温时会有沉淀析出,需加热溶解或放置37℃恒温箱中10 min至清亮方可使用。确保Buffer PW加入正确体积的无水乙醇。
	7. 菌液制备或保存不当	菌液摇菌时间过长或污染发生溶菌现象会导致质粒降解,应尽量选用新鲜菌体进行操作,细菌的培养时间不要超过16 h,最好控制在12-14 h。
	8. 吸附柱长期置于高温等不良环境	建议长期保存置于2~8℃中,或使用前加入100 μl的3 M NaOH溶液激活柱膜后使用。
产物纯度差	1. 基因组残留	加入Buffer P2后,必须温和颠倒混匀,处理多个样本时,裂解时间不要超过3 min。
	2. 盐离子残留	建议沿吸附柱管壁四周加入,有助于减少盐离子残留,或Buffer PW漂洗2次。
	3. RNA残留	已加入RNase A的Buffer P1长时间室温放置可能会出现酶活下降,使用后应及时放回2~8℃。菌体数量过多,导致Buffer P1中RNase A不足以消化菌体中的RNA,建议减少菌液体积。



Vazyme Biotech Co.,Ltd.

www.vazyme.com

400-600-9335 (China) +86 400-168-5000 (Global)

support@vazyme.com