



技术手册

PureYield™ Plasmid

Miniprep 系统

A1220, A1221 和 A1222 使用说明

原英文技术手册号码: TB374



www.promega.com.cn

编译于 8/08

编号: CTB374

PureYield™ Plasmid Miniprep 系统

所有技术资料均可在 www.promega.com/tbs/ 找到
请访问该网站，以确认您使用的是最新版本的技术手册。
如果您对使用此产品有疑问，请联系 Promega 的技术支持。
chinatech@promega.com.cn

1. 说明	1
2. 产品组分及储存条件	2
3. 使用前准备工作	3
4. PureYield™ 质粒小提系统操作方案	4
A. 离心方案	4
B. 真空方案	6
C. 大体积培养物的备选方案	7
5. 质粒及 E.Coli 菌株的选择和制备	7
6. 故障排除	8
7. 缓冲液及溶液配方	10
8. 相关产品	11

1. 说明

PureYield™ Plasmid Miniprep System(PureYield™ 质粒小提系统)^(a) 可纯化高质量的质粒 DNA，这些质粒 DNA 可用于真核细胞转染和体外蛋白表达。该系统采用硅膜纯化柱，进行质粒 DNA 的快速纯化。质粒 DNA 可在 10 分钟内纯化，与硅树脂或其它柱膜法相比，大大缩短了时间。实验的总耗时依赖于一次处理的样品数量。

PureYield™ 质粒小提系统采用了一种独特的内毒素去除洗涤液，可以从纯化的质粒中去除蛋白、RNA 和内毒素等污染物，提高了真核细胞转染、体外转录、体外转录/翻译偶联等高敏感度实验的成功率。纯化过程中不需要异丙醇沉淀，或繁杂的离心步骤，提供了高浓度质粒 DNA 的快速纯化方法。

1. 说明(接上)

0.6ml 转化了高拷贝质粒的过夜细菌培养物, 其总生物量为 1.3~8(培养物的 O.D.₆₀₀ 值 × 培养物的体积(μl))。PureYield™ 质粒小提系统可以从上述体系中纯化得到 1.5~7.5μg 质粒 DNA, $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 。如果期望得到更多产量, 可处理 1.5~3.0ml 培养物。当纯化低拷贝质粒时, 推荐的培养物体积为 3ml。

该系统可用于从 *E. coli* 中纯化任何质粒, 但是当质粒小于 20,000bp 时, 效率最高。为了得到最好的效果, 质粒大小应在 10,000bp 或以下。纯化后的质粒不需要进一步处理, 即可用于自动荧光 DNA 测序和其它常规分子生物学实验。当用于体外转录反应时, 纯化的质粒 DNA 应加入核糖核酸酶抑制剂, 如重组 RNasin® 核糖核酸酶抑制剂(Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Cat.# N2511)。本技术手册提供的实验方案描述了如何从 *E. coli* 中纯化质粒 DNA。质粒的产量会有变化, 取决于很多因素, 包括培养物体积、质粒拷贝数、培养基种类以及使用的菌株。第 5 部分提供了选择不同的菌株会如何对质粒 DNA 产量产生影响的信息。

2. 产品组分及存储条件

产品	规格	目录号
PureYield™ Plasmid Miniprep System	10 次	A1220

包括:

- 1ml Cell Lysis Buffer (CLC, 细胞裂解缓冲液, 蓝色)
- 4ml Neutralization Solution (NSC, 中和溶液)
- 2.5ml Endotoxin Removal Wash (ERB, 内毒素去除洗涤液)
- 1ml Column Wash Solution (CWC, 纯化柱洗涤液)
- 0.5ml Elution Buffer (EBB, 洗脱缓冲液)
- 10 PureYield™ Minicolumns (PureYield™ 纯化柱)
- 10 PureYield™ Collection Tubes (PureYield™ 收集管)
- 1 Protocol (操作手册)

产品	规格	目录号
PureYield™ Plasmid Miniprep System	50 次	A1221

包括:

- 5.5ml Cell Lysis Buffer (CLC, 细胞裂解缓冲液, 蓝色)
- 18ml Neutralization Solution (NSC, 中和溶液)
- 10.5ml Endotoxin Removal Wash (ERB, 内毒素去除洗涤液)
- 4.6ml Column Wash Solution (CWC, 纯化柱洗涤液)
- 3ml Elution Buffer (EBB, 洗脱缓冲液)
- 50 PureYield™ Minicolumns (PureYield™ 纯化柱)
- 1 Protocol (操作手册)

产品	规格	目录号
PureYield™ Plasmid Miniprep System	250 次	A1222

包括:

- 27ml Cell Lysis Buffer (CLC, 细胞裂解缓冲液, 蓝色)
- 90ml Neutralization Solution (NSC, 中和溶液)
- 2 × 27ml Endotoxin Removal Wash (ERB, 内毒素去除洗涤液)
- 25ml Column Wash Solution (CWC, 纯化柱洗涤液)
- 10ml Elution Buffer (EBB, 洗脱缓冲液)
- 250 PureYield™ Minicolumns (PureYield™ 纯化柱)
- 250 PureYield™ Collection Tubes (PureYield™ 收集管)
- 1 Protocol (操作手册)

储存条件: 除 Neutralization Solution(中和溶液)以外的其它组分储存于室温。将 Neutralization Solution(中和溶液)储存于 4~8℃。

⚠ Cell Lysis Buffer (CLC, 细胞裂解缓冲液)中的某些组分可能在运输过程中形成沉淀。为了使这些沉淀物完全重悬, 请将其在 30~37℃ 孵育 30 分钟, 颠倒混合。不要在微波炉中加热。

Cell Lysis Buffer (CLC, 细胞裂解缓冲液)中含有 NaOH, Endotoxin Removal Wash (ERB, 内毒素去除洗涤液)中含有离液剂。操作这些试剂时, 请使用适当的安全防护措施。

注意: 在本操作手册的所有下文中, 试剂盒中提供的 Cell Lysis Buffer (CLC, 细胞裂解缓冲液), Neutralization Solution (NSC, 中和溶液), Endotoxin Removal Wash (ERB, 内毒素去除洗涤液), Column Wash Solution (CWC, 纯化柱洗涤液) 以及 Elution Buffer (EBB, 洗脱缓冲液)均依次用细胞裂解缓冲液、中和溶液、内毒素去除洗涤液、纯化柱洗涤液和洗脱缓冲液表示。

3. 使用前准备工作

⚠ 在使用前, 将试剂盒提供的纯化柱洗涤液使用 95% 乙醇稀释, 如表 1。

表 1. 向纯化柱洗涤液中加入 95% 乙醇的体积

目录号	规格	加入 95% 乙醇的体积	总体积
A1220	10	4ml	5ml
A1221	50	24ml	28.6ml
A1222	250	100ml	125ml

加入乙醇后, 请在包装瓶的标签上标记“乙醇已加入”。

4. PureYield™ 质粒小提系统纯化方案

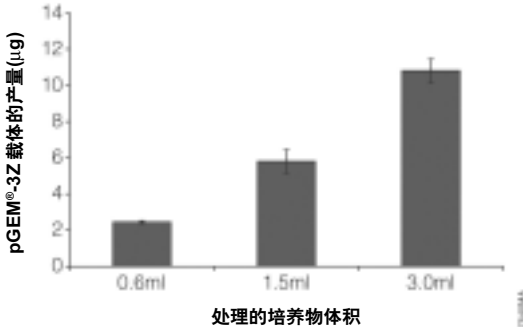


图 1. 质粒 DNA 产量。使用 PureYield™ 质粒小提系统从上述体积的培养物中纯化 pGEM®-3Z DNA。

4.A. 离心方案

检查细胞裂解缓冲液，确认其组分在运输过程中没有形成沉淀。如果发现沉淀形成，将其于 30~37℃ 孵育 30 分钟，颠倒混合，使其重悬。

我们推荐使用 LB 培养基。如果您使用其它的培养基，请将细胞离心成团，再用 TE 缓冲液或水重悬，然后再进行裂解。

要获得较高产量、较高纯度的质粒 DNA，以进行较高要求的下游操作如转染或偶联的转录/翻译反应，请按照 4.C 部分的方案进行操作，培养物的起始量不得低于 1.5ml。如果需要得到最高纯度的质粒 DNA，则推荐将细胞离心成团，因为在培养过程中，污染物会积存于细胞培养基中，导致 A_{260}/A_{230} 比值较低。

以下步骤均在室温下操作。

1. 将生长在 LB 培养基中的细菌培养物 600µl 转移到 1.5ml 离心管中。

注意：如果您希望处理更大体积的细菌培养物(最多为 3.0ml)，请使用 4.C 部分提供的操作方案。

2. 加入 100µl 细胞裂解缓冲液，颠倒混合 6 次。溶液应从不透明转为清亮的蓝色，表示裂解完全。

注意：在 2 分钟内须进行第 3 步。过度裂解将会导致质粒 DNA 变性。如果需要处理大批样品，请将这些样品分组处理，每组最多 10 个样品。在上一组 10 个样品全部被中和并充分混合后，再处理下一组。

3. 加入 350 μ l 冰冷的(4~8 $^{\circ}$ C)中和溶液，颠倒试管，充分混合。中和完全后，样品管内将会变成黄色，并有黄色沉淀物形成。再将样品管颠倒 3 次，确保中和完全。
4. 在离心机内以最大速度离心 3 分钟。
5. 将上清液(~900 μ l)转移到 PureYield™ 小提纯化柱。不要搅乱管底的细胞碎片团。为了得到最大产量，请使用加样枪头转移上清液。
6. 将纯化柱连接到 PureYield™ 收集管上，以最大速度离心 15 秒。
7. 弃除离心到收集管内的液体，将纯化柱重新连接到原来的收集管上。
8. 向纯化柱内加入 200 μ l 内毒素洗涤液。在最大速度下离心 15 秒。不需要弃除离心到收集管内的液体。
9. 向纯化柱内加入 400 μ l 纯化柱洗涤液。在最大速度下离心 30 秒。
10. 将纯化柱转接到一个干净的 1.5ml 离心管上，直接向纯化柱内加入 30 μ l 洗脱缓冲液。在室温下静置 1 分钟。

注意：

1. pH 中性的无核酸酶的水也可以用于洗脱 DNA。
2. 如果质粒较大(>10kb)，请将洗脱缓冲液在洗脱前加温至 50 $^{\circ}$ C，并将洗脱体积增加至 50 μ l。在进行第 11 步前，将纯化柱在室温下(22~25 $^{\circ}$ C)孵育 5-10 分钟。
11. 最大速度离心 15 秒，用于洗脱质粒 DNA。盖紧离心管的盖子，将洗脱下来的质粒 DNA 储存于 -20 $^{\circ}$ C。

4.B. 真空操作方案

检查细胞裂解缓冲液，确认其组分在运输过程中没有形成沉淀。如果发现
有沉淀形成，将其于 30~37℃ 孵育 30 分钟，颠倒混合，使其重悬。

我们推荐使用 LB 培养基。如果您使用其它的培养基，请将细胞离心成团，
再用 TE 缓冲液或水重悬，然后再进行裂解。

以下步骤均在室温下操作。

1. 将 1.5ml 细菌培养物转移到离心管中。

注意：如果您希望处理更大体积的细菌培养物（最多为 3.0ml），请使用 4.C
部分提供的操作方案。

2. 以最大速度离心 1 分钟。
3. 弃除上清。
4. 取 600µl TE 缓冲液或水重悬细胞团。
5. 加入 100µl 细胞裂解缓冲液，颠倒混合 6 次。溶液应从不透明转为清亮的蓝色，
表示裂解完全。

注意：在 2 分钟内须进行第 3 步。过度裂解将会导致质粒 DNA 变性。如果需
要处理大批样品，请将这些样品分组处理，每组最多 10 个样品。在上一组
10 个样品全部被中和并充分混合后，再处理下一组。

6. 加入 350µl 冰冷的(4~8℃)中和溶液，颠倒试管，充分混合。中和完全后，样
品管内将会变成黄色，并有黄色沉淀物形成。再将样品管颠倒 3 次，确保中
和完全。
7. 在离心机内以最大速度离心 3 分钟。将 PureYield™ 小提纯化柱连接在
VacMan® 或 VacMan® Jr. 真空多联器的 Luer-Lok® 接头上。
8. 将上清液(~900µl)转移进 PureYield™ 小提纯化柱。不要搅乱管底的细胞碎
片团。
9. 施加真空，使裂解液通过纯化柱。
10. 向纯化柱内加入 200µl 内毒素去除洗涤液。施加真空，使溶液通过纯化柱。
11. 向纯化柱内加入 400µl 纯化柱洗涤液。施加真空，使溶液通过纯化柱。解除
真空，移走纯化柱。

12. 将纯化柱连接到 PureYield™ 收集管上，在微型离心机上以最大速度离心 1 分钟。
13. 将纯化柱转接到一个干净的 1.5ml 离心管上，直接向纯化柱内加入 30 μ l 洗脱缓冲液。在室温下静置 1 分钟。
注意：pH 中性的无核酸酶的水也可以用于洗脱 DNA。
14. 最大速度离心 15 秒，用于洗脱质粒 DNA。盖紧离心管的盖子，将洗脱下来的质粒 DNA 储存于 -20℃。

4.C. 大体积培养物的备选方案

此备选方案用于使用 PureYield™ 质粒小提系统处理多达 3ml 的细菌培养物。当使用低拷贝质粒时，我们推荐使用 3.0ml 细菌培养物。

1. 在微型离心机上以最大速度将 1.5ml 细菌培养物离心 30 秒。
2. 弃除上清液。
3. 如需处理总量为 3.0ml 的细菌培养物，则再向同一离心管内加入 1.5ml 细菌培养物。重复步骤 1 和步骤 2。
4. 加入 600 μ l TE 缓冲液或水，将细胞团重悬。
5. 参照本手册 4.A 部分，从第 2 步开始进行后续步骤。

5. 质粒和 *E. Coli* 菌株的选择和制备

使用 PureYield™ 质粒小提系统可从过夜培养的 *E. coli* 细菌中纯化质粒 DNA。质粒的产量取决于很多因素，包括质粒拷贝数、细菌细胞的密度、培养基类型以及使用的菌株。

质粒拷贝数是一个重要的 DNA 产量的影响因素。质粒的拷贝数主要取决于复制起始区域及其周围的 DNA 序列。这个区域即复制子，通过细菌的酶复合体来控制质粒 DNA 的复制。有些 DNA 序列比较特殊，当其插入进某些特定质粒时，将干扰复制，使质粒的拷贝数降低。

在新鲜的 LB 琼脂板（含抗生素）上挑选一个单一的、边界清楚的克隆，接种到 1-10ml 的 LB 培养基中（同样含有抗生素）。接种后的培养基应在 37℃ 下孵育过夜（12-16 小时）。高拷贝质粒、 A_{600} 的值为 2.0-4.0 时，可确保细菌达到了适合的生长密度，可进行收集和质粒 DNA 纯化。

6. 故障排除

如遇到未在此涉及的问题, 请联系 Promega 当地分公司或经销商。
E-mail: chinatech@promega.com.cn

问题	原因及建议
A_{260}/A_{230} 比值低	<p>细菌培养过度。细胞代谢副产物积存在培养基内, 致使 A_{260}/A_{230} 比值降低。请使用培养时间低于20小时的培养物。</p> <p>有些培养基的组分可与PuerYield™质粒小提纯化柱的膜基质发生亲和反应, 致使 A_{260}/A_{230} 比值降低。我们推荐: 如果使用 LB 培养基, 可进行直接裂解如果使用其它培养基, 则应先离心去除培养基, 然后使用水或 TE 缓冲液将细菌细胞重悬, 然后再进行裂解。</p> <p>进行质粒纯化前, 使用 4.C 部分介绍的操作方案离心富集细菌细胞。当细菌细胞先经离心富集、然后再用水或 TE 缓冲液重悬时, 得到的质粒 DNA 的纯度最高。</p>
细胞裂解不完全	<p>细菌细胞过多。请使用 A_{600} 值为 2.0-4.0 的细菌培养物。所有培养体系均应含有抗生素。请使用本手册推荐的低拷贝、高拷贝质粒的培养物体积 (最多为 3ml)</p> <p>细菌细胞团没有充分重悬。在细胞裂解之前, 充分将细胞团重悬。使用重悬液振荡、吹打细胞团。重悬后, 不应存在可见的小细胞团。</p>
没有纯化到质粒 DNA	<p>质粒 DNA 定量方法不准确。请使用琼脂糖凝胶电泳及 EB 染色来进行质粒 DNA 定量。使用的是低拷贝质粒, 且处理的培养物的量仅为 0.6ml。请使用 3.0ml 带有低拷贝质粒的细菌培养物。</p> <p>培养时通风不利。培养基与空气的最佳比例是 1:4 或更低 (20% 培养基、80% 空气)。为了得到最佳通风效果, 请使用带通气隔板的培养瓶, 或使用带通气孔的或可透气的封口膜来封闭培养试管, 培养时要充分振摇。</p> <p>使用的培养基不正确。推荐使用 LB 培养基, 用于 4.A 中描述的直接裂解方法。其它培养基不能用于直接裂解, 但是可使用备选方案 (4.C)</p>

问题	原因及建议
质粒 DNA 产量低	使用的培养物体积过大。标准的离心方案中使用的是 0.6ml 培养物。处理 1.5~3.0ml 细菌培养物时, 可获得更大的产量 (4.B, 4.C)。
	没有将澄清的裂解液充分转移至纯化柱。澄清液可被直接倾倒入纯化柱, 但是要得到最大产量, 则应使用移液枪头来转移上清。
	非转化的细菌在培养体系内生长过度。确认在液体培养基和固体培养基内都添加了抗生素。
	细菌培养物时间过长。请将从过夜培养板上新近分离的细菌克隆接种到含有抗生素的培养基内。在 37°C 下培养 12~16 小时。
	使用的是低拷贝质粒。当使用低拷贝质粒时, 请使更大体积的培养物 (4.C)。即使是使用更大体积的培养物, DNA 的产量也比高拷贝质粒的产量低。
	质粒 DNA 的定量不准确。请使用琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色, 不要依赖于分光光度法来定量 DNA。
质粒 DNA 缺刻	对于较大的质粒 (>10kb), 请在洗脱前, 将洗脱缓冲液加热到 50°C, 并把洗脱体积增加到 50µl。同时, 在离心前, 将纯化柱在室温下 (22~25°C) 孵育 5~10 分钟。
	碱裂解步骤时孵育时间过长。使用细胞裂解缓冲液处间请不要超过 2 分钟。
	自动荧光测序时的结果不好测序反应中加入的 DNA 过少。将新近分离的 <i>E.Coli</i> 克隆接种于新鲜的 LB 培养基内。纯化质粒 DNA, 并使用琼脂糖凝胶电泳及 EB 染色对 DNA 定量。
	洗脱 DNA 时使用的是 TE 缓冲液。重新纯化质粒 DNA, 使用无核酸酶的水来洗脱。
质粒 DNA 的浓度定量不准确。请采用琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色对质粒 DNA 进行准确定量。	

6. 故障排除(接上)

问题	原因及建议
限制性内切酶消化无结果	<p>增加限制性内切酶的浓度或消化时间。请在推荐的温度下孵育,使用针对该限制性内切酶的优化的反应缓冲液。</p> <p>将质粒 DNA 进行乙醇沉淀,以去除可能残留的盐。</p> <p>离心不充分。请确认所有离心步骤都是在微型离心机的最大转速下进行的。</p>
基因组 DNA 污染	<p>在细胞裂解步骤进行振荡或过度混合可导致基因组DNA的污染。在加入了细胞裂解溶液后,请不要振荡样品,以避免基因组 DNA 被剪切。</p> <p>用错了试剂。请仅使用 PureYield™ 质粒小提系统内的组分。PureYield™ 质粒小提系统和 Wizard® Plus SV 系统的组分不能互换。</p>

7. 缓冲液和溶液配方

洗脱缓冲液

10mM	Tris-Hcl (pH8.5)
0.1mM	EDTA

8. 相关产品

产品	规格	目录号
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25 次	A2492
	100 次	A2495
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	10 次	A2392
	25 次	A2393

®U.S. Pat. No. 6,184,562, Australian Pat. No. 740145 and Canadian Pat. No. 2,329,067 have been issued to Promega Corporation for endotoxin reduction in nucleic acid purification. Other patents are pending.

© 2008 Promega Corporation. All Rights Reserved.

pGEM, RNasin, Vac-Man and Wizard are registered trademarks of Promega Corporation. PureYield is a trademark of Promega Corporation.

Luer-Lok is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.



普洛麦格（北京）生物技术有限公司

地址：北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心B座907-909



Promega

www.promega.com.cn