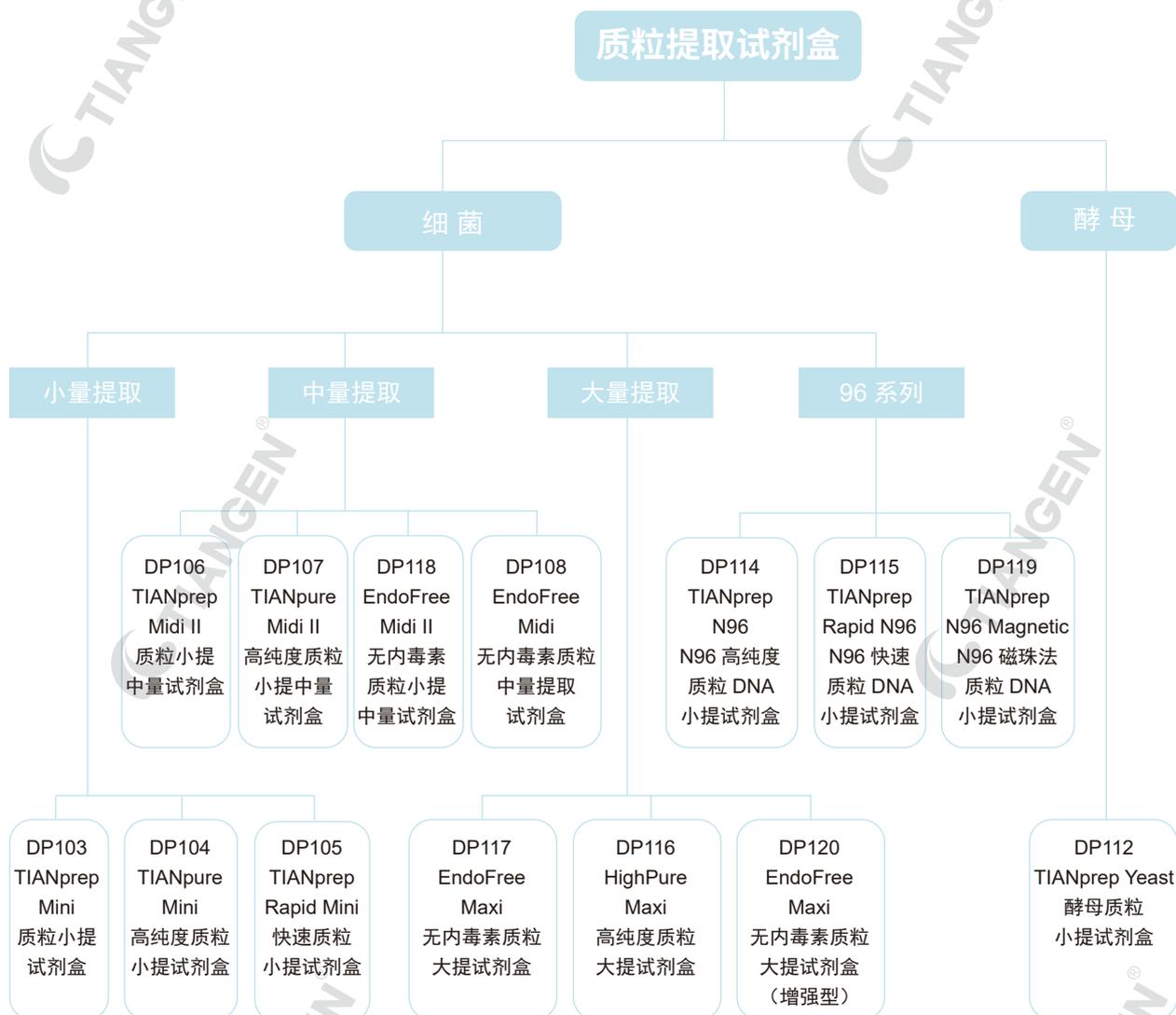


质粒提取试剂盒选择指南

TIANGEN 公司生产的质粒提取系列产品，采用碱裂解法和独特的硅基质吸附材料特异性吸附质粒 DNA，得到的质粒 DNA 纯度高。



质粒提取技术简介

质粒简介

质粒 (Plasmid) 是一种染色体外的稳定遗传因子, 大小从 1-200 kb 不等, 为双链、闭环的 DNA 分子, 并以超螺旋状态存在于宿主细胞中。质粒主要存在于细菌、放线菌和真菌细胞中, 它具有自主复制和转录能力, 能在子代细胞中保持恒定的拷贝数, 并表达所携带的遗传信息。

质粒提取原理及流程

较常用的质粒 DNA 提取方法有 3 种: 碱裂解法、煮沸法和去污剂 (如 Triton 和 SDS) 裂解法。前两种方法比较剧烈, 适用于较小的质粒 (<15 kb)。去污剂裂解法则比较温和, 一般用于分离大质粒 (>15 kb)。

碱裂解法是一种应用最为广泛的制备质粒 DNA 的方法, 其原理为: 染色体 DNA 比质粒 DNA 分子大得多, 且染色体 DNA 为线状分子, 而质粒 DNA 为共价闭环环状分子; 当用碱处理 DNA 溶液时, 线状染色体 DNA 容易发生变性, 共价闭环的质粒 DNA 在回到中性时即恢复其天然构象; 变性染色体 DNA 片段与变性蛋白质和细胞碎片结合形成沉淀, 而复性的超螺旋质粒 DNA 分子则以溶解状态存在液相中, 离心去除沉淀后, 就可从上清中回收质粒 DNA (图 1)。

目前, 市场上质粒提取试剂盒大多数都是采取上述的碱裂解方法, 不同之处在于纯化方式。目前比较常用的纯化系统是硅基吸附材料, 其原理为在高盐环境下质粒 DNA 能够结合到硅基质上, 然后用低盐缓冲液或水将质粒 DNA 从硅基质上洗脱下来。得到的质粒可以用于酶切、PCR、测序、细菌转化、转染等分子生物学实验。

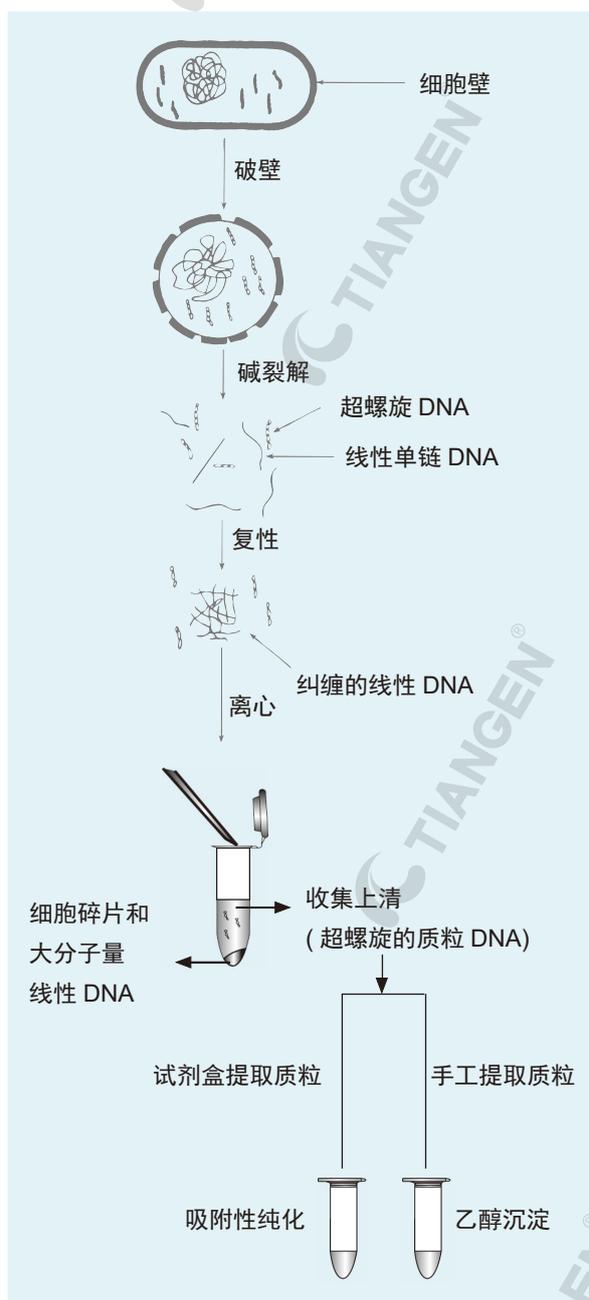


图 1 质粒提取原理

影响质粒提取的因素

质粒提取的得率和质量与很多因素有关, 如宿主菌的种类和培养条件, 细胞的裂解, 质粒拷贝数, 质粒的稳定性, 抗生素, 吸附柱的吸附量等。

宿主菌种类

质粒主要存在于细菌、放线菌和真菌细胞中, 多数情况下我们是从大肠杆菌中提取质粒。大肠杆菌的菌株不同会影响质粒提取的质量。从宿主菌如 DH5 α 和 TOP10 中可以得到高质量的质粒 DNA。HB101 和它的衍生菌株, 如 TG1 和 JM 系列会在裂解时产生大量的糖类, 如果没有完全去除, 将抑制后续实验中的酶活性, 影响质粒 DNA 提取的质量。另外, 有些菌株有非常高的核酸酶活性, 会降低 DNA 的得率。因此推荐使用 DH5 α 和 TOP10。

培养时间

从固体培养基平板上挑取一个单菌落，接种到培养物中（含有相关抗生素的液体培养基中），振荡培养 12-16 h。

抗生素

在菌株的各生长阶段都应加入抗生素筛选。现在用的许多质粒都不含有在细胞分裂时确保平均分配的 par 位点，无质粒的子细胞在无抗生素时复制速度远大于含质粒的细胞。

表 1 抗生素的浓度

抗生素	贮液浓度	保存条件	严紧型质粒	松弛型质粒
氨苄青霉素	50 mg/ml(溶于水)	-20℃	20 μg/ml	100 μg/ml
羧苄青霉素	50 mg/ml(溶于水)	-20℃	20 μg/ml	100 μg/ml
氯霉素	34 mg/ml(溶于无水乙醇)	-20℃	34 μg/ml	170 μg/ml
卡那霉素	10 mg/ml(溶于水)	-20℃	10 μg/ml	50 μg/ml
链霉素	10 mg/ml(溶于水)	-20℃	10 μg/ml	50 μg/ml
四环素	5 mg/ml(溶于无水乙醇)	-20℃	10 μg/ml	50 μg/ml

质粒拷贝数

质粒拷贝数常用的定义是指生长在标准的培养基下每个细菌细胞中所含有的质粒 DNA 分子的数目。每个细胞中的质粒数主要决定于质粒本身的复制起始机制。按照复制性质，可以把质粒分为两类：一类是严紧型质粒，当细胞染色体复制一次时，质粒也复制一次，每个细胞内只有 1-2 个质粒，如 F 因子；另一类是松弛型质粒，当染色体复制停止后仍然能继续复制，每一个细胞内一般有 20 个左右质粒，如 ColE1 质粒。一般分子量较大的质粒属严紧型。分子量较小的质粒属松弛型。质粒的复制有时和它们的宿主细胞有关，某些质粒在大肠杆菌内的复制属严紧型，而在变形杆菌内则属松弛型。

表 2 一些常用的质粒和粘粒的拷贝数

质粒种类	拷贝数	复制起始点	类型
质粒			
pUC18/19 载体	500-700	pMB1	高拷贝
pBluescript 载体	300-500	ColE1	高拷贝
pGM-T 载体	300-400	pMB1	高拷贝
pTZ 载体	>1000	pMB1	高拷贝
pBR322 载体	15-20	pMB1	低拷贝
pACYC 及其衍生载体	10-122	p15A	低拷贝
pSC101 及其衍生载体	5	pSC101	低拷贝
粘粒			
SuperCos	10-20	ColE1	低拷贝
pWE15	10-20	ColE1	低拷贝

菌液收集及裂解

细菌收集可以通过离心来进行，不同的质粒拷贝数，菌液量的需求不同，对于低拷贝的质粒，要相应增加菌液量。菌液是在碱性环境下裂解的，由于不同的宿主菌细胞壁厚薄的差异，细胞的破壁程度不同，对于细胞壁较厚的宿主菌，首先要进行破壁处理：

革兰氏阴性菌——不用特殊处理，碱裂解时就能有效破壁。

革兰氏阳性菌——溶菌酶（目录号 RT401）处理。

酵母和丝状真菌——溶壁酶（目录号 RT410-02）处理或玻璃珠研磨。

质粒提取

菌液收集、重悬浮以及宿主菌细胞破壁后,细胞在 NaOH/SDS(P2 溶液)中裂解。SDS 溶解细胞膜的磷脂和蛋白成分,使细胞的内容物如染色体、质粒 DNA 和蛋白在碱性环境下变性,但是长时间处在碱性环境中会导致质粒发生不可恢复的变性。变性的质粒在琼脂糖胶上跑的较快,而且不能被限制性内切酶消化。裂解产物在缓冲液 P3 中被调整到中性高盐环境,使得变性的蛋白、染色体 DNA,细胞碎片和 SDS 都沉淀下来,而复性的质粒留在上清溶液中。为了防止染色体 DNA 污染质粒 DNA,要避免剧烈振荡,以防止染色体 DNA 被打断,造成对质粒 DNA 的污染。因为染色体 DNA 的片段和质粒 DNA 在高盐条件下,都可以与硅胶膜结合,在低盐的条件下,用洗脱液都能从膜上洗脱下来。因此,在裂解过程中要缓慢、轻柔颠倒离心管。吸附柱最大吸附量不同,会影响质粒提取的得率。

质粒 DNA 分离和纯化

纯化要求

质粒 DNA 中不应存在对后续实验中酶活有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子,避免其它生物大分子如蛋白质、多糖、脂类、基因组和 RNA 的污染。

不同的后续实验对于质粒纯度的要求不同,常规的分子生物学实验(如酶切、测序等)普通纯度的质粒可以满足实验,而对于转染实验,要求质粒的纯度较高(如高纯度或无内毒素)。可以选择不同的质粒提取试剂盒以满足不同的实验要求。

纯化方法

用硅基材料吸附质粒 DNA 来代替乙醇沉淀的纯化方式,提取的质粒纯度高、操作方便快捷。可选择的试剂盒有三种类型,按照质粒提取的纯度从低到高为:普通质粒提取试剂盒、高纯度质粒提取试剂盒和无内毒素质粒提取试剂盒。

质粒 DNA 的洗脱和收集

参见质粒 DNA 提取流程。

质粒的保存

溶解在洗脱液 EB/TB 中的质粒 DNA,也可以贮存在 TE 缓冲液中(用水溶解的质粒只能短期保存,因为实验室用的纯水呈弱酸性,质粒在酸性环境下会发生酸解),4℃短期保存或 -20℃和 -70℃长期保存。

质粒鉴定与评价

琼脂糖电泳检测

碱裂解法提取的质粒经琼脂糖电泳进行鉴定时,理想状况是只出现超螺旋一条带,但在质粒提取过程中,由于机械力、酸碱度、试剂等原因,使质粒 DNA 链发生断裂,可能出现两条带或者出现三条带,电泳迁移率从快到慢,分别是超螺旋、开环和复制中间体(即没有复制完全的两个质粒连在一起)(如图 3)。如果加溶液 P2 后过度剧烈振荡,就会出现大肠杆菌基因组 DNA 的片段。非常偶然的是,有时候提取的质粒会出现 4 条以上的条带,这是由于特殊的 DNA 序列导致了不同程度的超螺旋(超螺旋的圈数不同)所致。但是,只要质粒经单酶切鉴定后,只有单一条带,就证明没有基因组的污染。

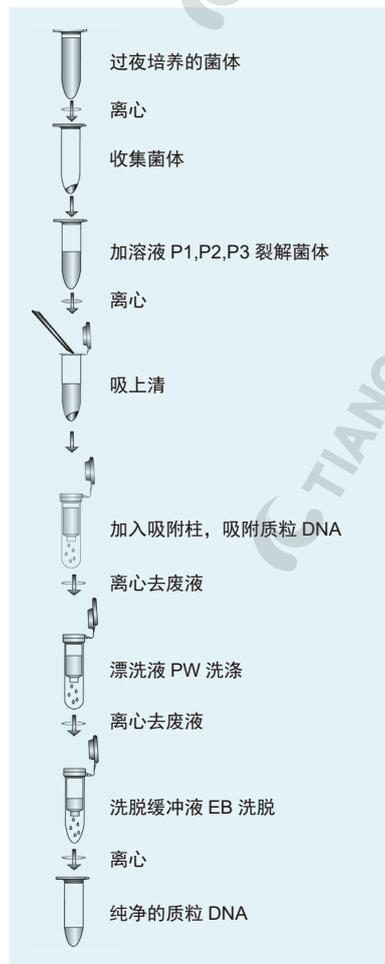


图 2 质粒提取流程

酶切检测

质粒提取后，为了进一步鉴定质粒是否正确，可进行酶切鉴定，通过与 Marker 对比，确定质粒的分子量大小 (如图 4)。

用紫外线分光光度计检测

浓度测定标准为：OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7-1.9 之间说明所得 DNA 纯度较好。比值若低于 1.7 可能有蛋白污染，若高于 2.0 则 DNA 有可能已降解，也可能是有 RNA 污染。如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子浓度会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

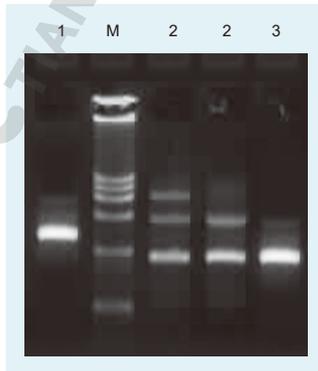


图 3 质粒琼脂糖凝胶电泳检测 (0.8% Agarose)

M: 1 kb plus Marker;

1: 质粒单酶切;

2: 超螺旋、开环质粒、质粒复制中间体;

3: 超螺旋质粒。

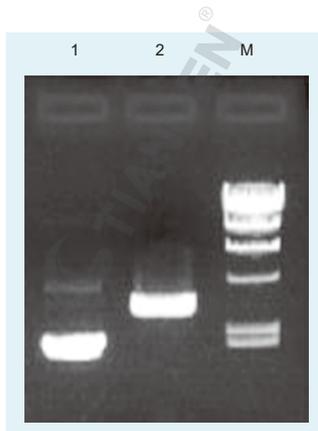


图 4 TIANGEN 质粒小提试剂盒提取的质粒酶切电泳图 (1% Agarose)

M: λ DNA/Hind III Marker;

1: 质粒 pBS-T;

2: 质粒 pBS-T digested by EcoR I。

质粒小提试剂盒

TIANprep Mini Plasmid Kit

——基于硅胶膜技术，轻松获得高质量质粒

目录号	包装	价格
DP103-02	50 次	190 元
DP103-03	200 次	680 元

产品包装

试剂盒组成	50 次	200 次
RNase A(10 mg/ml)	150 μ l	600 μ l
平衡液 BL	30 ml	120 ml
溶液 P1	15 ml	60 ml
溶液 P2	15 ml	60 ml
溶液 P3	20 ml	80 ml
去蛋白液 PD	30 ml	120 ml
漂洗液 PW	15 ml	50 ml
洗脱缓冲液 EB	15 ml	30 ml
吸附柱 CP3	50 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	200 个

产品简介

本试剂盒采用硅胶膜吸附技术，操作简单、快速。菌体经碱裂解法处理后通过离心吸附柱，专一性结合 DNA，洗去杂质，高效快速提取多至 30 μ g 的质粒 DNA。

本试剂盒采用独特的缓冲液配方，有效去除蛋白杂质及其它有机化合物，每次可处理 1-5 ml 菌液。得到的 DNA 比传统试剂盒纯度更高，可直接用于酶切、转化、测序及 PCR 等分子生物学实验。

产品特点

- 快速：步骤少，操作简单，节省时间。
- 高效：可提取菌体 85% 以上质粒 DNA。

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

高纯度质粒小提试剂盒

TIANpure Mini Plasmid Kit

——获得的高纯度质粒可直接用于高精度分子生物学实验

目录号	包装	价格
DP104-02	50 次	300 元

产品包装

试剂盒组成	50 次
RNase A(10 mg/ml)	150 μ l
平衡液 BL	30 ml
溶液 P1	15 ml
溶液 P2	15 ml
溶液 P3	20 ml
去蛋白液 PD	30 ml
漂洗液 PW	15 ml
洗脱缓冲液 TB	15 ml
过滤柱 CS	50 个
吸附柱 CP3	50 个
收集管 (2 ml)	100 个

产品简介

本试剂盒可在提取质粒的同时去除痕量蛋白及其它杂质，提取多至 30 μ g 的高纯度质粒 DNA，尤其适用于含核酸酶较多的宿主菌株。得到的质粒 DNA 可直接用于转染等高精度分子生物学实验。

产品特点

- 高纯度：提取的质粒 DNA 可直接用于转染等高要求实验。
- 快速：步骤少，操作简单，节省时间。
- 高效：可提取菌体 85% 以上质粒 DNA。

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

提示

TIANGEN 的质粒提取试剂盒既适用于革兰氏阴性菌中质粒的提取，同时也可从革兰氏阳性菌中提取质粒。由于革兰氏阳性菌有一层较厚的细胞壁，会严重阻碍细菌细胞的裂解，因此必须在裂解细胞前破除，其破除方法如下：收集适量的菌体，加入 250 μ l 溶液 P1 或 TE，充分悬浮菌体，加入溶菌酶使其终浓度为 10-20 mg/ml，37 $^{\circ}$ C 处理 30 min 左右。加入溶菌酶的浓度和处理的时间可根据不同的菌株和具体实验条件进行调整。

快速质粒小提试剂盒

TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit

——快速的碱裂解技术，8 min 获得高质量质粒

目录号	包装	价格
DP105-02	50 次	190 元
DP105-03	200 次	680 元

产品包装

试剂盒组成	50 次	200 次
溶液 P1	15 ml	60 ml
溶液 P2	15 ml	60 ml
溶液 P5	20 ml	80 ml
漂洗液 PWT	15 ml	50 ml
洗脱缓冲液 TB	15 ml	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	150 μ l	600 μ l
TIANRed	75 μ l	300 μ l
吸附柱 CP3	50 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	200 个

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

自备试剂

无水乙醇

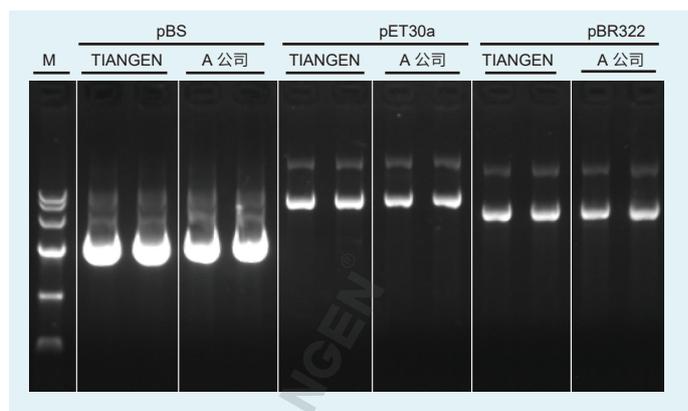
产品简介

本试剂盒采用硅胶膜吸附技术, 高效专一地结合质粒 DNA, 操作简单、快速。每次处理 1-4 ml 过夜培养的细菌培养液, 仅需 8 min 即可提取多至 24 μ g 的质粒 DNA。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

产品特点

- 快速: 步骤少, 操作简单, 仅需 8 min。
- 高效: 可提取菌体 85% 以上质粒 DNA。
- 配备了独特的 TIANRed 试剂, 可以清晰辨别抽提过程中样本的裂解程度, 确保得到高效率、高质量的质粒 DNA。

实验例

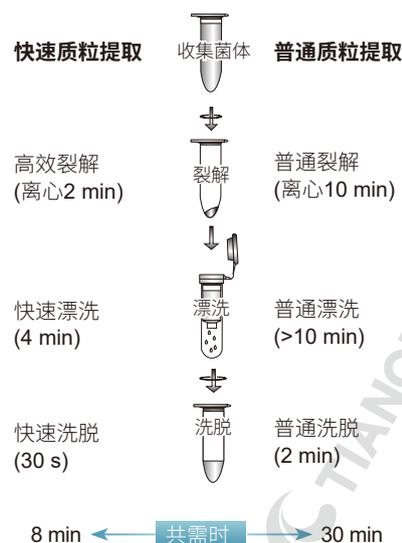


分别应用 TIANGEN 快速质粒小提试剂盒和某国外 A 公司的质粒小量制备试剂盒, 同时提取以上样本的质粒 DNA, 提取 3 ml 菌液 (菌浊度 $OD_{600}=1.8$), 洗脱体积 50 μ l; 上样量 pBS 1 μ l, pET30a 3 μ l, pBR322 3 μ l; 琼脂糖凝胶浓度为 1%, 6 v/cm 电泳 30 min。

结果显示, 对于不同的质粒, TIANGEN 快速质粒小提试剂盒与某国外公司的普通质粒提取试剂盒得率相当。

M: TIANGEN DNA Marker IV

提取流程对比



DP105通过高效裂解液的处理及优化的缓冲体系, 在节约大量操作时间的同时, 轻松得到更高质量的产物。

酵母质粒提取试剂盒

TIANprep Yeast Plasmid DNA Kit

—改进的碱裂解法，快速从酵母细胞中得到高质量的质粒

目录号	包装	价格
DP112-02	50 次	300 元

产品包装

试剂盒组成	50 次
RNase A(10 mg/ml)	150 μ l
平衡液 BL	30 ml
溶液 YP1	15 ml
溶液 YP2	15 ml
溶液 YP3	20 ml
去蛋白液 PD	30 ml
漂洗液 PW	15 ml
洗脱缓冲液 EB	15 ml
吸附柱 CP2	50 个
收集管 (2 ml)	50 个

产品简介

本试剂盒对普通的碱裂解法进行了改进，可快速得到高纯质粒 DNA，并去除基因组 DNA。通过离心吸附柱吸附、洗涤 DNA，方便快捷，可同时处理多个样品。除适用于酵母细胞外，也可用于大肠杆菌。质粒得率与酵母菌株、质粒拷贝数、培养条件等因素有关。

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

质粒小提中量试剂盒

TIANprep Midi Plasmid Kit

—小量提取，即可得到中量质粒

目录号	包装	价格
DP106-02	50 次	300 元

产品包装

试剂盒组成	50 次
RNase A(10 mg/ml)	300 μ l
平衡液 BL	30 ml
溶液 P1	30 ml
溶液 P2	30 ml
溶液 P3	40 ml
去蛋白液 PD	30 ml
漂洗液 PW	15 ml
洗脱缓冲液 EB	15 ml
吸附柱 CP4	50 个
收集管 (2 ml)	50 个

产品简介

本试剂盒采用硅胶膜吸附技术，操作步骤与离心柱型小提试剂盒相同，吸附载量可多至 70 μ g，得到的 DNA 可直接用于酶切、转化、测序及 PCR 等分子生物学实验。

产品特点

- 大 量：一次可处理 5-15 ml 菌液，提高实验效率。
- 快 速：步骤少，操作简单，节省时间。
- 高 效：可提取菌体 85% 以上质粒 DNA。

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

高纯度质粒小提中量试剂盒

TIANpure Midi Plasmid Kit

—小量提取，即可得到高纯度中量质粒

目录号	包装	价格
DP107-02	50 次	360 元

产品包装

试剂盒组成	50 次
RNase A(10 mg/ml)	300 μ l
平衡液 BL	30 ml
溶液 P1	30 ml
溶液 P2	30 ml
溶液 P3	40 ml
去蛋白液 PD	30ml
漂洗液 PW	15 ml
洗脱缓冲液 TB	15 ml
过滤柱 CS	50 个
吸附柱 CP4	50 个
收集管 (2 ml)	100 个

产品简介

本试剂盒在离心柱型质粒提取试剂盒基础上，增加了本公司特制的过滤柱 CS，可在提取质粒的同时去除痕量蛋白及其它杂质，提取的高纯度质粒 DNA 可多至 70 μ g，适用于需较大量质粒的动物细胞转染等高精度分子生物学实验。

产品特点

- 高纯度：提取的质粒 DNA 可直接用于转染等高要求实验。
- 大 量：一次可处理 5-15 ml 菌液，提高实验效率。
- 快 速：步骤少，操作简单，节省时间。
- 高 效：可提取菌体 85% 以上质粒 DNA。

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

无内毒素质粒中量提取试剂盒

EndoFree Midi Plasmid Kit

——快速获得转染级质粒的中量提取试剂盒

目录号	包装	价格
DP108	10次	680元

产品包装

试剂盒组成	10次
平衡液 BL	30 ml
溶液 P1	30 ml
溶液 P2	30 ml
溶液 E3	15 ml
溶液 EBT	70 ml
漂洗液 GDE	30 ml
漂洗液 MRDE	36 ml
漂洗液 PWF	16 ml
洗脱缓冲液 TB	15 ml
RNase A(100 mg/ml)	150 μ l
过滤器 CS1	10个
吸附柱 CP7	10个
收集管 (15 ml)	20个

产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒 DNA。同时采用特殊的溶液 EBT 和过滤器 CS1，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需 1 h，方便快捷。

产品特点

- 适用于从 50-100 ml 菌液中提取质粒。
- 所获得质粒内毒素残留低，满足于高质量的转染。
- 采用独特的快速内毒素去除方法，操作更为便捷。

下游应用

- 适用于酶切、测序、细胞转化、细胞转染、显微注射等分子生物学及细胞生物学实验。

保存条件

置于室温 (15-30°C) 干燥条件下

质粒得率范围

质粒类型	推荐提取菌液量	得率
高拷贝质粒	50 ml	250-750 μ g
低拷贝质粒	100 ml	100-300 μ g

提取流程



实验例

质粒得率比较

质粒名称	试剂盒公司	质粒浓度 (ng/ μ l)	质粒得率 (μ g)
pEGFP-C1	TIANGEN	1427.9	714
	A 公司	1061.1	530

使用 TIANGEN 无内毒素质粒中量提取试剂盒 (DP108)，从 50 ml 过夜培养的菌液中提取 pEGFP-C1 质粒，通过 Nanodrop 检测质粒浓度并计算得率。实验结果显示，TIANGEN 无内毒素质粒中量提取试剂盒在质粒得率优于国外 A 公司同类产品。

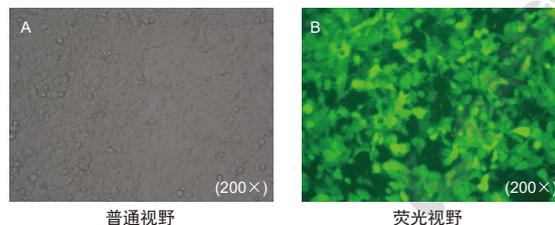


图 1: 转染实验

TIANGEN 无内毒素质粒提取试剂盒提取的 pEGFP-C1 质粒，使用 TIANGEN TIANfect 转染试剂 (RM204) 转染接种 12 h 后汇合度约 80% 的 293T 细胞，转染 24-36 h 后观察 GFP 荧光，统计转染效率为 80-90%。

无内毒素质粒小提中量试剂盒

EndoFree Mini Plasmid Kit II

——小量提取，即可得到中量转染级质粒

目录号	包装	价格
DP118-02	50 次	580 元

产品包装

试剂盒组成	50 次
平衡液 BL	30 ml
溶液 P1	30 ml
溶液 P2	30 ml
溶液 P4	30 ml
去蛋白液 PD	30 ml
漂洗液 PW	15 ml
洗脱缓冲液 TB	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	300 μ l
过滤柱 CS	50 个
吸附柱 CP4	50 个
收集管 (2 ml)	100 个

自备试剂

- 无水乙醇、异丙醇

产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒 DNA。同时采用特殊的去内毒素系统，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需 1 h，方便快捷。质粒提取得率与质粒拷贝数、宿主菌的种类和培养条件等因素有关，每次处理 5-15 ml 过夜培养的细菌培养液，提取多至 70 μ g 的质粒 DNA。

产品特点

- 快速高产：1 h 左右提取 5-70 μ g 质粒。
- 质粒纯度高：特殊的去内毒素体系配合 CP4 吸附柱特异吸附核酸，内毒素含量低。
- 应用广泛：适用于酶切、PCR、测序、连接、转化等常规实验及基因治疗、细胞显微注射、基因沉默、转染等高端实验。

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

实验例

质粒得率范围

质粒类型	菌液量	得率
低拷贝质粒	5-15 ml	5-25 μ g
高拷贝质粒	5-15 ml	15-70 μ g

适于高 / 低拷贝质粒提取

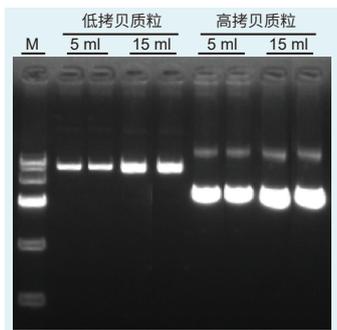


图 1：使用 TIANGEN 无内毒素质粒小提中量试剂盒提取不同体积质粒，洗脱体积 200 μ l，低拷贝 (pBR322) 上样 3 μ l、高拷贝 (pBS) 上样 2 μ l，琼脂糖凝胶浓度 1%，6 V/cm 电泳 30 min。

质粒适用于细胞转染

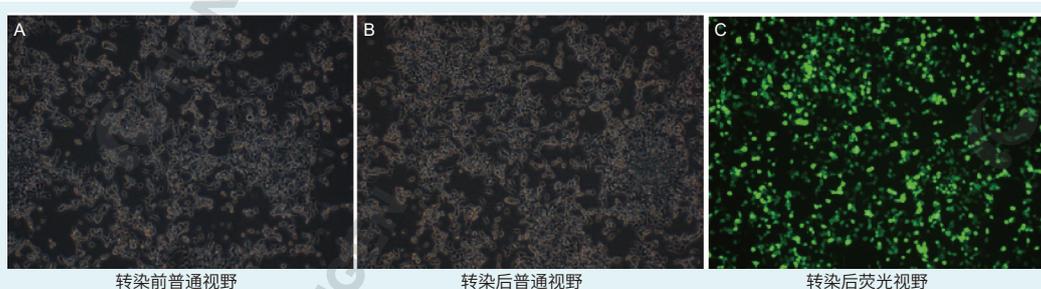


图 2：使用 TIANGEN DP118 提取的 pEGFP 质粒转染 293T 细胞，转染 48 h 后观察细胞状态检测 GFP 荧光。

高纯度质粒大提试剂盒

HighPure Maxi Plasmid Kit

——快速从大量菌液中最大限度获得高纯度质粒

目录号	包装	价格
DP116	10次	680元

产品包装

试剂盒组成	10次
RNase A(100 mg/ml)	500 μ l
溶液 P1	100 ml
溶液 P2	100 ml
溶液 P4	100 ml
TIANRed 试剂	500 μ l
洗脱缓冲液 TB	30 ml
过滤器 CS1	10个

保存条件

室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 保存

产品简介

本试剂盒采用独特的缓冲系统，同时加入 TIANGEN 公司特制的颜色指示剂，保证有效地得到大量高纯度质粒。使用本试剂盒可根据不同的实验需求，灵活地选择处理菌液的初始体积，并采用传统的异丙醇沉淀方法，快速地获得大量高纯度的质粒 DNA，满足多种不同的后续实验需求。

产品特点

- 得率高：异丙醇直接沉淀，最高可获得 1.5 mg 质粒 DNA。
- 纯度高：经缓冲液 P4 和过滤器 CS1 处理，满足多数转染实验要求。
- 简便快捷：只需简单的几步离心，1 h 左右完成实验。
- 应用广泛：适用于酶切、PCR、转化、测序和转染等分子生物学实验，颜色指示剂使您的质粒提取效率更有保证。

颜色指示剂

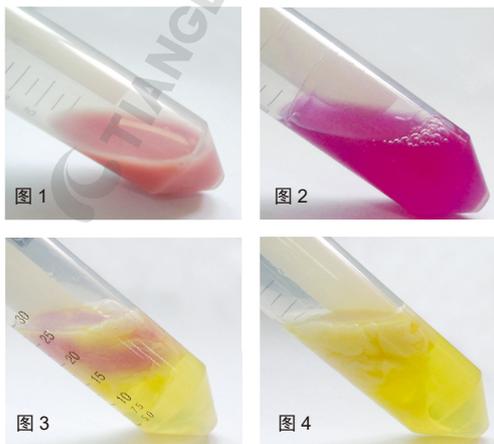


图 1: 菌体中加入含 TIANRed 指示剂的 P1 溶液，彻底混匀后溶液为混浊的红色。

图 2: 添加 P2 彻底混匀后，溶液颜色为澄清的紫色。如果在紫色中混有混浊的红色，则裂解不充分，会大大影响质粒的提取效率，需继续混匀至颜色变为澄清的紫色。

图 3-4: 添加 P4 彻底混匀后，溶液颜色为澄清的黄色。如果在黄色中混有紫色 (图 3 所示)，则复性不充分，会导致得到双螺旋质粒质量减少，需继续混匀至颜色变为澄清的黄色 (图 4 所示)。

实验例

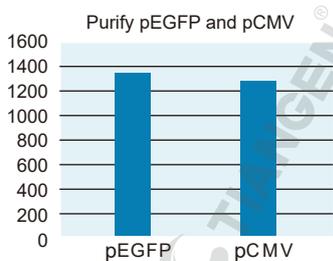


图 5 ■ yields(μ g)

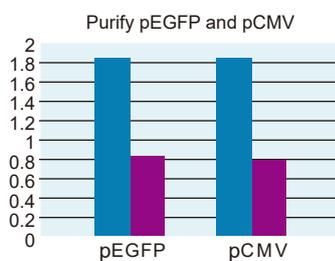


图 6 ■ OD₂₆₀/OD₂₈₀
■ OD₂₂₀/OD₂₆₀

用 TIANGEN 公司高纯度质粒大提试剂盒提取 100 ml 菌液的 pEGFP 质粒和 pCMV 质粒 (pEGFP: OD₆₀₀ = 1.95 ; pCMV: OD₆₀₀ = 2.05)

图 5: 质粒提取得率
图 6: 质粒纯度

质粒得率范围

质粒类型	处理量	得率
高拷贝质粒	菌液 100 ml	获得 500 μ g-1.5 mg 质粒
低拷贝质粒	菌液 200 ml	获得 200 μ g-400 μ g 质粒

无内毒素质粒大提试剂盒

EndoFree Maxi Plasmid Kit

——轻松从大量菌液中高效获得转染级质粒

目录号	包装	价格
DP117	10次	980元

产品包装

试剂盒组成	10次
RNase A(100 mg/ml)	500 µl
平衡液 BL	30 ml
溶液 P1	100 ml
溶液 P2	100 ml
溶液 P4	100 ml
漂洗液 PW	70 ml
洗脱缓冲液 TB	30 ml
过滤器 CS1	10个
吸附柱 CP6	10个
收集管 (50 ml)	20个

保存条件

室温 (15-30°C) 保存

产品简介

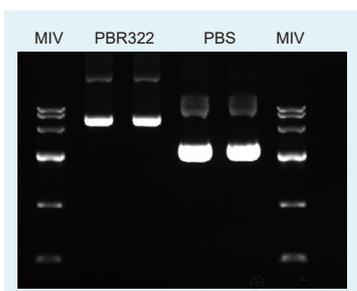
本试剂盒采用独特硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒 DNA。同时采用高效的去内毒素系统，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质，操作简单方便，可同时操作多个样品，从而大大节约时间。质粒提取量与质粒拷贝数多少、菌种、培养条件等因素有关，每次可处理 100-200 ml 细菌培养液，提取多达 1.5 mg 的质粒 DNA。

产品特点

- 快速高产：1 h 左右提取 200 µg-1.5 mg 质粒，超螺旋结构质粒较多。
- 质粒纯度高：特殊缓冲体系配合 CP6 吸附柱特异吸附核酸，内毒素含量低。
- 转染高效：适于大多数细胞株的高级转染实验。
- 应用广泛：适用于酶切、PCR、测序、连接、转化等常规实验及基因治疗、细胞显微注射、基因沉默、转染等高端实验。

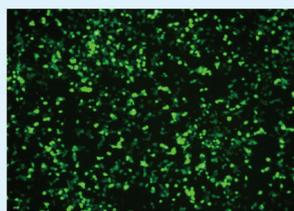
实验例

分别提取高 / 低拷贝质粒



提取 200 ml 菌液 (菌浊度 $OD_{600}=1.8$)，低拷贝 pBR322 质粒，产物溶于 1 ml TB，浓度 0.6 µg/µl，点样 2 µl
提取 100 ml 菌液，高拷贝 PBS 质粒，产物溶于 1 ml TB，浓度 1.2 µg/µl，点样 2 µl
MIV: TIANGEN DNA Marker IV

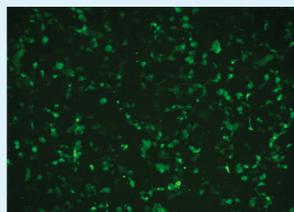
TIANGEN 无内毒素质粒大提试剂盒提取 pEGFP 质粒，转染内毒素不敏感型 293T 细胞系和内毒素敏感型 Huh7 细胞系，使用 TIANGEN DNAfectin 转染试剂转染后 24 h 观察荧光。



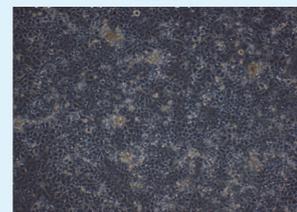
质粒 pEGFP 转染 293T 细胞
(荧光视野)



质粒 pEGFP 转染 293T 细胞
(普通视野)



质粒 pEGFP 转染 Huh7 细胞
(荧光视野)



质粒 pEGFP 转染 Huh7 细胞
(普通视野)

质粒得率范围

质粒类型	处理量	得率
高拷贝质粒	菌液 100 ml	获得 500 µg-1.5 mg 质粒
低拷贝质粒	菌液 200 ml	获得 200-600 µg 质粒

无内毒素质粒大提试剂盒 (增强型)

EndoFree Maxi Plasmid Kit V2

——适用于敏感细胞转染的无内毒素级别质粒

目录号	包装	价格
DP120-01	10次	1080元

产品包装

试剂盒组成	10次
平衡液 BL	30 ml
溶液 P1	125 ml
溶液 P2	125 ml
溶液 P4	125 ml
去内毒素溶液 ER	32 ml
缓冲液 ED	220 ml
漂洗液 PW	50 ml
洗脱缓冲液 TB	30 ml
RNase A(10 mg/ml)	1.25 ml
过滤器 CS1	10个
吸附柱 CP6	10个
收集管 (50 ml)	20个

自备试剂

无水乙醇 / 异丙醇

保存条件

室温 (15-30°C) 保存

产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒 DNA。同时采用去内毒素溶液 ER 和过滤器 CS1，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需 1 h，方便快捷。推荐每次菌液使用量：高拷贝质粒推荐使用量为 100 ml，得率一般在 500-1500 μg 左右；低拷贝质粒推荐使用量为 200 ml，得率一般在 50-300 μg 左右。

产品特点

- 高纯度：采用独特的内毒素沉淀技术，特异的去除内毒素。
- 操作简便：采用吸附柱技术特异吸附质粒，操作更为简便。
- 高效转染：适合包括内毒素敏感细胞在内的绝大多数细胞的转染。
- 应用广泛：动植物细胞转染、分子生物学实验均可应用。

下游应用

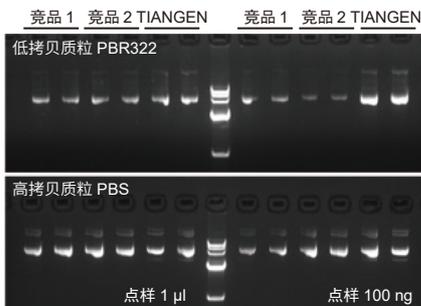
- 使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

实验例 1



独特的内毒素去除试剂能够高效的去除反应体系中的内毒素残留，获得高纯度质粒，质粒内毒素残留 ≤ 0.1 EU/μg

实验例 2



不同产品均采用相同体积的洗脱液进行洗脱，分别上样 1 μl，判断质粒浓度；并依据吸光值浓度上样 100 ng，判断是否存在虚高现象。
结论：电泳检测低拷贝质粒，DP120 得率最高；竞品存在明显的虚高现象。

实验操作流程



质粒提取相关试剂

目录号	产品名称	包装	价格
RK101-01	溶液 P1	15 ml	20 元
RK101-02		60 ml	60 元
RK102-01	溶液 P2	15 ml	20 元
RK102-02		60 ml	60 元
RK103-01	溶液 P3	20 ml	40 元
RK103-02		80 ml	120 元
RK109-03	溶液 P4	100 ml	480 元
RK111-01	溶液 P5	20 ml	40 元
RK111-02		80 ml	120 元
RK140	溶液 YP1	15 ml	30 元
RK141	溶液 YP2	15 ml	30 元
RK142	溶液 YP3	20 ml	40 元
RK105-01	去蛋白液 PD	30 ml	70 元
RK105-02		120 ml	250 元
RK113-01	漂洗液 PW	15 ml	20 元
RK113-02		50 ml	48 元
RK120-02	洗脱缓冲液 EB	30 ml	30 元
RT410-02	Lyticase (10 U/μl) 溶壁酶	3000 U	240 元
RK126-C	吸附柱 CP2	50 套 / 包	200 元
RK127-C	吸附柱 CP3	50 套 / 包	200 元
RK128-C	吸附柱 CP4	50 套 / 包	250 元
RK130-C	吸附柱 CP6	10 个 / 包	250 元
RK124	RNase-Free 过滤柱 CS	50 个 / 包	150 元
RK136	过滤柱 CS1	1 个	20 元

Q&A 质粒提取常见问题分析

在质粒提取过程中，最常出现问题的主要是裂解步骤，应小心操作。下面列出几种常见问题及可能原因：

Q 未提出质粒或质粒得率较低

A-1 大肠杆菌老化

——一般甘油保存菌株，需先活化。

——请涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体种子培养，取种液 1/1000 接种，正式培养。

A-2 质粒拷贝数低

——由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低，可更换具有相同功能的高拷贝数载体。

A-3 菌体中无质粒

——有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如，柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定，因此不要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。

——摇菌时间过长造成的菌种死亡，如含 PUC18 的大肠杆菌摇菌时间不超过 14 h。

A-4 碱裂解不充分

——使用过多菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液 P1、P2 和 P3 的用量。对低拷贝数质粒，如果菌体量超过 5 ml，提取时应加倍使用溶液 P1、P2 和 P3，有助于增加质粒提取量和质粒质量。

A-5 溶液使用不当

——溶液 P2、P3 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37℃ 保温片刻直至溶液清亮，才能使用。

质粒提取

A-6 吸附柱过载

——不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，请分多次提取。若用富集培养基，例如 TB 或 2×YT，菌液体积必须减少；若质粒或宿主菌是非常高的拷贝数或生长率，则需调整 LB 培养液体积。

A-7 质粒未全部溶解

——洗脱溶解质粒时，可适当加温或延长溶解时间。

A-8 乙醇残留

——漂洗液洗涤后可用延长离心时间的方法尽量去除残留液体，再加入洗脱缓冲液。

A-9 洗脱液加入位置不正确

——洗脱液应加在硅胶膜中心部位，以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面，使洗脱效率达到最大。

A-10 洗脱液不合适

——DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，如洗脱缓冲液 EB/TB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) 或水。洗脱效率取决于 pH 值。最大洗脱效率在 pH7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60°C 后使用有利于提高洗脱效率。

A-11 洗脱体积太小

——洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高，但质粒浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。

A-12 裂解时间过长

——加入溶液 P2 后裂解时间不应超过 5 min。

A-13 洗脱时间过短

——洗脱时间对回收率也会有一定影响。洗脱时放置 2 min 再离心，可达到较好的效果。

Q 质粒纯度不高**A-1** 混有蛋白

——不要使用过多菌体。溶液 P1、P2、P3 处理并离心后溶液应为澄清的，如果还混有微小蛋白悬浮物，可再次离心去除后再进行下一步骤。

A-2 混有 RNA

——减少菌体用量或加入溶液 P3 之后室温放置一段时间。如果已加入 RNase A 的溶液 P1 已保存 6 个月以上，请在溶液 P1 中重新添加 RNase A。

——对于大提试剂盒，严格控制异丙醇的加量。

A-3 混有基因组 DNA

——加入溶液 P2 和 P3 后应温和混匀，如果剧烈振荡，可能把基因组 DNA 剪切成碎片从而混杂在质粒中。如果加入溶液 P2 后过于粘稠，无法温和混匀，请减少菌体用量。细菌培养时间过长会导致细胞和 DNA 的降解，不要超过 16 h。

A-4 P3 溶液加入时间过长

——P3 溶液加入后，放置时间不要过长，否则有可能会产生小片段 DNA 污染。

A-5 含大量核酸酶的宿主菌

——有些宿主菌含大量核酸酶，在质粒提取过程中降解质粒 DNA，影响提取质粒 DNA 的完整性，最好选用不含核酸酶的大肠杆菌宿主菌，如 DH5 α 或 Top10。

——使用去蛋白液 PD，去除残留核酸酶。

A-6 乙醇残留

——漂洗液洗涤后可用延长离心时间的方法尽量去除残留液体，再加入洗脱缓冲液。

A-7 质粒的二聚体和多聚体形式

——是在质粒复制过程中形成的，与宿主菌相关，电泳可见，但不影响后续的酶切、转化、测序等实验。

Q 宿主菌为 G⁺，如何提质粒？**A**

G⁺ 菌要加溶菌酶进行破壁处理。处理方法：收集适量的菌体，加 250 μl P1 悬浮菌体后，加入溶菌酶使其终浓度为 10-20 mg/ml，37°C，处理 30 min。加入溶菌酶的浓度和处理的时间可根据不同的菌株和具体实验条件进行调整。以后的操作按照说明书进行。

部分使用 TIANGEN 质粒提取类产品发表的文献列表

题目	期刊	IF	使用产品	单位
Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion	Nature Biotechnology	31.864	质粒小提	上海科技大学
Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion	Nature Biotechnology	31.864	质粒小提	上海科技大学
Nascent Pre-rRNA Sorting via Phase Separation Drives the Assembly of Dense Fibrillar Components in the Human Nucleolus	Molecular Cell	14.548	质粒小提	中科院上海生化细胞所
Resistance to nonribosomal peptide antibiotics mediated by d-stereospecific peptidases	Nature Chemical Biology	12.154	质粒小提	香港科技大学
Epstein-Barr virus-encoded microRNA BART1 induces tumour metastasis by regulating PTEN-dependent pathways in nasopharyngeal carcinoma	Nature Communications	11.47	质粒小提	南方医科大
RNA-splicing factor SART3 regulates translesion DNA synthesis	Nucleic Acids Research	11.147	质粒小提	中科院基因组所
The nucleoskeleton protein IFFO1 immobilizes broken DNA and suppresses chromosome translocation during tumorigenesis	Nature Cell Biology	17.728	快速质粒小提	北京大学
Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales	Cell	36.216	质粒小提中量	中科院生物物理所
A Tyrosine Phosphorylation Cycle Regulates Fungal Activation of a Plant Receptor Ser/Thr Kinase	Cell Host & Microbe	15.753	高纯质粒小提中量	中山大学
The conserved 3' UTR-derived small RNA NarS mediates mRNA crossregulation during nitrate respiration	Nucleic Acids Research	11.147	快速质粒小提	复旦大学 上海医学院
AcrIIA5 Inhibits a Broad Range of Cas9 Orthologs by Preventing DNA Target Cleavage	Cell Reports	7.815	无内毒素小提中量	中科院生物物理所
CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development	Nature Cell Biology	17.728	无内毒素质粒大提	中科院上海生化细胞所
Integrative Analysis of Zika Virus Genome RNA Structure Reveals Critical Determinants of Viral Infectivity	Cell Host & Microbe	15.753	无内毒素质粒大提	清华大学
BACE1 SUMOylation increases its stability and escalates the protease activity in Alzheimer's disease	PNAS	9.58	无内毒素质粒大提	华中科技大学 同济医学院
Targeted genetic screening in mice through haploid embryonic stem cells identifies critical genes in bone development	PLOS Biology	8.386	无内毒素质粒大提	中科院上海生化细胞所