货号：BR2D101

Plasmid Miniprep Kit

V03

产品概述

Plasmid Miniprep Kit 质粒小提试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，利用独特的硅胶膜吸附柱在高盐状态下、低 pH 状态下特异性的吸附质粒 DNA，去除蛋白质、RNA、基因组和其它杂质，得到高质量、高纯度的质粒 DNA。每个吸附柱可吸附高达 30 μg 的质粒 DNA，适用于从 1~5 mL 的过夜培养的大肠杆菌高效提取质粒 DNA。质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件、细胞的裂解、质粒拷贝数、质粒稳定性等因素有关。本试剂盒提取的质粒 DNA 可直接应用于酶切、连接、PCR、测序、转化等各种分子生物学常规实验。

产品组分

Components	BR2D101-01 50T	BR2D101-02 200T
Buffer P1	15 mL	60 mL
Buffer P2	15 mL	60 mL
Buffer P3	20 mL	80 mL
Buffer PD	30 mL	120 mL
Buffer PW	15 mL	50 mL
Elution Buffer	15 mL	30 mL
Spin Columns with Collection Tubes	50 套	200 套
RNase A（10 mg/mL）	150 μL	600 μL

保存条件

试剂盒在室温（15~30°C）干燥条件下保存 18 个月。若溶液产生沉淀，使用前可在 37°C水浴中预热 10 min 以溶解沉淀，不影响效果。RNase A 在-20±5°C保存 18 个月。第一次使用前将 RNase A 全部加入到 Buffer P1 中，混匀后保存于 2~8°C，可稳定保存 6 个月。

自备材料

无水乙醇

注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. Buffer PW 首次使用前需加入 4 倍体积的无水乙醇进行稀释（例如：15 mL Buffer PW 中添加 60 mL 无水乙醇；50 mL Buffer PW 中添加 200 mL 无水乙醇），于室温保存。错误稀释或未稀释会导致 DNA 无法挂柱结合，致提取失败。
3. Buffer P1 在首次使用前需加入 RNase A（将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入），混匀后保存于 2~8°C。
4. 请勿皮肤直接接触 Buffer P2 和 Buffer P3，使用完后应立即盖紧盖子，以免 pH 发生变化。
5. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
6. 菌液培养时间不宜过长，用量不宜超过 5 mL，如菌密度较大，需按照比例酌情增加 Buffer P1、P2、P3 的用量，以免过载。
7. 洗脱体积越大，洗脱得率越高。若需得到较高浓度的质粒，可以适当减少洗脱体积，但最小体积应不少于 30 μL，体积过小会降低洗脱效率。

操作步骤

注：Buffer PW 首次使用前需加入 4 倍体积的无水乙醇。Buffer P1 在首次使用前需加入 RNase A。

1. 取 1~5 mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，12,000 rpm 离心 1 min，弃上清液（尽量去除上清液，可以多次离心将菌体收集至一个离心管中）。

2. 向收集有菌体沉淀的离心管中加入 250 µL 的 Buffer P1（使用前请检查是否已加入 RNase A），使用涡旋震荡器进行充分混匀，确保菌体沉淀被完全悬浮（注：如果有未充分混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低）。

3. 向离心管中加入 250 µL 的 Buffer P2，温和上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解。（注：请勿剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 断裂混合到提取的质粒当中。此时菌液变得透亮粘稠，裂解时间不宜超过 5 min，以免质粒受到破坏。如果菌液没有变得透亮，可能是菌体太多裂解不充分导致，可减少菌体量。）

4. 加入 350 µL 的 Buffer P3，立即温和地上下翻转 6~8 次，充分混匀，此时出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 离心 10 min。（注：加入 Buffer P3 后应该立即混匀，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。）

5. 将上一步离心获得的上清液使用移液器转移至吸附柱中，尽量不要吸取到沉淀。12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。

6. 可选步骤：加入 500 µL 的 Buffer PD，12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。

注：如果宿主菌是 end A+（TG1，BL21，HB101，JM 系列，ET12567 等），这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒 DNA，推荐采用此步。如果宿主菌是 end A-（DH5α，TOP10 等），此步骤可省略。

7. 加入 600 µL 的 Buffer PW（第一次使用前请检查是否加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。重复此步骤。

8. 12,000 rpm 离心 2 min，彻底去除残留的 PW。

9. 将吸附柱置于一干净的离心管中，开盖室温静置 2 min。在吸附柱中央加入 50~100 µL 的洗脱液或去离子水（提前 60~70°C 预热，洗脱效果会更好），静置 1 min。12,000 rpm 离心 2 min 回收质粒 DNA，保存于-20°C。若需要提高质粒浓度，建议将得到的溶液重新加入吸附柱中，重复此步骤进行二次洗脱。

常见问题与解决方案

1. 提取质粒 DNA 产量低：质粒拷贝数低引起质粒提取量低可更换具有相同功能的高拷贝数载体；对低拷贝数质粒或大于 10 kb 的打质粒进行提取时，应加大菌体使用量，使用 5~10 mL 过夜培养的菌液，可加倍使用 Buffer P1、P2、P3；碱裂解不充分导致提取浓度低可减少菌液体积或增加 Buffer P1、P2、P3 的用量。

2. 基因组 DNA 污染：菌体培养时间太长，菌体培养时间应控制在 12~16 h；在加入 Buffer P2、P3 时必须温和地混匀，剧烈震荡会导致基因组 DNA 断裂混合到提取的质粒当中；同时处理多个样品时，加入 Buffer P2 时算起，总时间不要超过 5 min。

3. 洗脱效率低：将洗脱液预热至 60~70°C，并重复二次洗脱。

4. 盐污染：请使用 Buffer PW 洗脱两次，Buffer PW 可沿着吸附柱的管壁四周加入，加入后盖盖颠倒混匀 2~3 次有助于完全冲洗管壁上残留的盐分。