



质粒小量提取试剂盒说明书

货号：WGD-X-3100001

产品介绍

本试剂盒对传统的碱裂解法进行了优化，并采用先进的硅胶膜吸附技术，优化的裂解液能使离心吸附柱在短时间内高效、特异性地吸附质粒 DNA，且最大限度地除去蛋白质、多糖和 RNA 等其它杂质。本试剂盒适用于提取 1~5 mL 过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、培养条件、质粒拷贝数、质粒稳定性、抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 纯度高，能够直接用于酶切、PCR、连接、测序、转化等一系列常规生物学实验。

产品目录

产品名称	规格
质粒小量提取试剂盒	50 rxns
	200 rxns

产品组成

组分	50 rxns	200 rxns
平衡液 BL	30 mL	120 mL
重悬液 P1	15 mL	60 mL
裂解液 P2	15 mL	60 mL
中和液 P3	20 mL	80 mL
漂洗液 PW	15 mL	50 mL
洗脱液 EB	15 mL	30 mL
RNase A（10 mg/mL）	150 μL	600 μL
吸附柱 E8	50 个	200 个
收集管	50 个	200 个

产品用途

用于 1~5 mL 菌液低拷贝或高拷贝质粒提取。

产品特点

高效、快速地得到高质量质粒 DNA。

注意事项

1. 重悬液 P1 在使用前需加入 RNase A，混匀，置于 2~8℃保存。
2. 首次使用前请按漂洗液 PW 瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇，混匀，室温保存。
3. 使用前请先检查裂解液 P2 和中和液 P3 是否出现浑浊，如有浑浊现象，可 37℃条件下温浴至溶液澄清，混匀后再使用。
4. 注意不要直接接触裂解液 P2、中和液 P3，使用时应戴手套，使用后应立即盖紧盖子。
5. 提取的质粒得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、稳定性等因素有关。
6. 操作过程中需要自备若干无内毒素的 1.5 mL 离心管、无水乙醇。
7. 实验前使用平衡液 BL 处理吸附柱，可以充分激活硅质膜，提高得率；处理后的吸附柱最好当天使用，放置



时间长会影响效果。

操作步骤

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 E8 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ L 的平衡液 BL，12,000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱 E8 重新放回收集管中。
- 注意：请使用当天处理过的吸附柱**
2. 取 1~5 mL 过夜培养的大肠杆菌菌液，加入离心管中，12,000 $\times$ g 离心 1 min，尽量吸除上清。
- 注意：菌体量以能够充分裂解为佳，过多的菌体裂解不充分会降低质粒的提取效率。**
3. 向留有菌体沉淀的离心管内加入 250 μ L 重悬液 P1（请检查是否加入 RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮菌体沉淀。
- 注意：彻底重悬菌体沉淀对产量很关键，重悬后应看不到菌体团块，若存在团块，会影响裂解过程，导致得率降低。**
4. 向离心管中加入 250 μ L 裂解液 P2，轻柔温和地上下翻转 6~8 次，使菌体充分裂解。
- 注意：此步骤应温和地混匀，剧烈振荡或涡旋会引起基因组 DNA 断裂，造成污染。此时菌液应该变得清亮粘稠，表明细菌裂解充分。若菌液未变清亮，可能由于菌体过多导致裂解液不彻底，应当适当减少菌体量。**
5. 向离心管中加入 350 μ L 中和液 P3，立即轻柔地上下颠倒混匀 10~15 次，12,000 $\times$ g 离心 10 min。
- 注意：加入中和液 P3 后应立即混匀，避免产生局部沉淀。若上清液中含有大量微小白色沉淀，可适当延长离心时间。**
6. 将上一步的上清液用移液器转移到吸附柱 E8 中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀，12,000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 E8 放入收集管中。
7. 向吸附柱 E8 中加入 600 μ L 漂洗液 PW（请先检查是否加入无水乙醇），12,000 $\times$ g 离心 1min，倒掉收集管中的废液，把吸附柱 E8 重新放回收集管中。
8. 重复操作步骤 7。
9. 12,000 $\times$ g 离心 2 min，去除吸附柱 E8 中残余的漂洗液 PW。
- 注意：漂洗液中的乙醇残留会影响后续的酶反应（酶切或 PCR），故建议打开吸附柱盖子，置于室温放置数分钟或 55 $^{\circ}$ C 烘箱静置 2 min，使残留的乙醇彻底挥发干净；**
10. 将吸附柱 E8 置于一个新的 1.5 mL（或 2 mL）离心管中，加入 50~100 μ L 的洗脱液 EB，室温放置 2 min，12,000 $\times$ g 离心 2 min 洗脱 DNA，提取到的质粒 DNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 注意：洗脱液体积不应少于 50 μ L，体积过小影响回收效率。若需获得最高产量，将洗脱液 EB 预热至 55 $^{\circ}$ C 提高洗脱效率，或将得到的离心液重新加入到吸附柱 E8 中，再次 12,000 $\times$ g 离心 1 min，进行二次洗脱。**

储存及运输条件

15~30 $^{\circ}$ C 保存 12 个月。单独包装的 RNase A 在室温可保存 12 个月。加入 RNase A 和指示剂的重悬液 P1 应置于 2~8 $^{\circ}$ C 保存，可稳定保存 6 个月。

常温（15~30 $^{\circ}$ C）运输。

常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
质粒产量低	菌液量不够	增加菌液用量。
	菌液浓度不够	延长摇菌时间。
	宿主菌老化	缩短摇菌时间，选择活性更高的宿主菌。
	质粒拷贝低或质粒片段长 (> 10 kb)	应加大菌体使用量，使用 5~10 mL 过夜培养物，同时按照比例增加 P1、P2、P3 的用量，洗脱液 EB 应在 65~70 $^{\circ}$ C 水浴预热，在吸附和洗脱时可以适当的延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。
	裂解不充分	按照说明书操作及要求，逐步操作；减少菌体用量；或适当等比例增加重悬液 P1、裂解液 P2 和中和液 P3 的用量。



质粒纯度低	洗脱不充分	将洗脱液加热到 55℃；确保滴加到吸附柱膜中央；延长洗脱放置时间。
	RNA 残留	确保重悬液 P1 在 4℃保存；减少菌液用量。
	基因组 DNA 残留	加入裂解液 P2 后避免剧烈振荡；缩短裂解时间。
	盐离子残留	加入漂洗液后颠倒混匀 2~3 次；加入漂洗液后延长放置时间。