

【产品概述】

本试剂盒采用经典的 SDS 碱裂解法和先进的硅胶膜吸附技术，适用于从 1~5 mL 过夜培养的大肠杆菌菌液中提取高质量质粒 DNA。收集的菌体裂解处理后，经过离心、吸附、洗涤、洗脱等步骤，可以最大程度去除蛋白质等杂质，从而获得高纯度质粒 DNA 用于酶切、扩增、测序、连接、转化等各种常规分子生物学实验。试剂盒操作简单、快速，内附质粒吸附柱载量约为 30 µg。

【产品组分】

组分	M1PD02-01 (50 次)	M1PD02-02 (200 次)
柱平衡液	10 mL	40 mL
溶液 I	10 mL	40 mL
溶液 II	10 mL	40 mL
溶液 III	15 mL	60 mL
洗涤液 I *	15 mL *	60 mL *
洗涤液 II **	6 mL **	25 mL **
洗脱液	5 mL	20 mL
RNase A ***	0.3 mL ***	1.2 mL ***
质粒吸附柱及收集管	50 套	200 套

* 首次使用前加入 15 mL (M1PD02-01) 或 60 mL (M1PD02-02) 无水乙醇。

** 首次使用前加入 24 mL (M1PD02-01) 或 100 mL (M1PD02-02) 无水乙醇。

***首次使用前将 RNase A 全部加入溶液 I，混匀后置于 2-8℃保存，可稳定保存 6 个月。

【储存和运输】

常温运输，其中 RNase A 于 -20℃保存，其余组分室温（15-25℃）保存。产品有效期 1 年。

【注意事项】

- 自备无水乙醇；自备离心机、水浴锅或金属浴、涡旋仪，以及 1.5/2.0 mL 无核酶离心管。
- 质粒吸附柱于室温（15-25℃）密闭保存，长期保存建议置于 2-8℃。
- 溶液 I 使用前请加入 RNase A（将试剂盒提供的 RNase A 全部加入溶液 I），混匀后置于 2-8℃ 保存，可稳定保存 6 个月。
- 溶液 II 遇低温易析出，使用前先检查是否有晶体析出。如有晶体析出，可置于 37℃ 加热至完全溶解，混匀后使用。使用后应立即盖紧盖子。
- 洗涤液 I 和洗涤液 II 在第一次使用前请加入指定体积的无水乙醇，充分混匀并在瓶上做好标记。
- 可以使用去离子水、TE 溶液代替洗脱液进行洗脱，使用去离子水时其 pH 不应低于 7。
- 处理低拷贝质粒时，可适当增加菌液体积，并按比例扩大溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的用量。
- 实验操作时应注意做好个人防护，包括穿戴实验服、手套、护目镜等，不要直接接触试剂。

【实验操作】

1. 柱平衡：将质粒吸附柱置于配套收集管中，加入 **200 μL 柱平衡液**，12,000 rpm ($13,400 \times g$) 离心 1 min，弃滤液，将质粒吸附柱放回收集管。
注意：仅在使用前进行平衡处理，处理后当天使用。
2. 将 1-5 mL 过夜培养的大肠杆菌菌液 12,000 rpm ($13,400 \times g$) 离心 1 min 收集菌体，菌液较多时通过多次离心的方式进行收集，离心后尽量吸除上清。
3. 向离心管中加入 **200 μL 溶液 I**（确认已按要求加入 RNase A），使用移液器吹打或涡旋仪振荡使菌体彻底悬浮。
注意：保证菌体无团块状、彻底重悬对提高质粒 DNA 得率和质量至关重要。
4. 向离心管中加入 **200 μL 溶液 II**，温和地上下颠倒混匀 6~8 次，室温放置，至溶液透明清亮。
注意：不要剧烈振荡，避免基因组 DNA 污染；放置时间不超过 5 min，避免质粒受损；如果溶液未变清亮，可能由于菌体过多裂解不彻底，应减少菌体量；溶液 II 使用后应迅速盖紧瓶盖。
5. 向离心管中加入 **300 μL 溶液 III**，立即温和地上下颠倒 6~8 次至形成白色絮状沉淀，然后 $\geq 12,000$ rpm ($\geq 13,400 \times g$) 离心 5-10 min。离心后上清应为澄清状，若漂有微小白色颗粒，不影响后续操作。
6. 转移上清到质粒吸附柱中，尽量不要吸出底部沉淀，12,000 rpm ($13,400 \times g$) 离心 1 min，弃滤液，将质粒吸附柱放回收集管。
7. 加入 **600 μL 洗涤液 I**（确保已按要求加入无水乙醇），12,000 rpm ($13,400 \times g$) 离心 1 min，弃滤液，将质粒吸附柱放回收集管。



8. 加入 **600 μL 洗涤液 II**（确保已按要求加入无水乙醇），12,000 rpm（13,400 $\times g$ ）离心 1 min，弃滤液，将质粒吸附柱放回收集管。
9. 12,000 rpm（13,400 $\times g$ ）离心 2 min，去除洗涤液残留。

注意：洗涤液中含有乙醇，乙醇残留可能会影响质粒 DNA 纯度（OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值）以及下游实验。

10. 将质粒吸附柱置于新的 1.5 mL 或 2.0 mL 无核酶离心管（自备）中，在吸附膜中央滴入 **50-100 μL 洗脱液**，静置 2 min，12,000 rpm（13,400 $\times g$ ）离心 1 min，弃吸附柱。收集得到的质粒 DNA 可以直接用于下游反应，或置于-20℃冰箱保存备用。

注意：可以使用 65℃预热的洗脱液，或在加入洗脱液后将离心管连同质粒吸附柱一起置于 65℃孵育 5 min，以增加质粒洗脱效率。也可以将洗脱液二次上柱，静置后再次离心洗脱，以增加质粒得率。

【常见问题及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
质粒 DNA 产量低	细菌未充分裂解	细菌成团会裂解不充分从而降低产量，确保菌体在溶液 I 中充分重悬，加入溶液 II 后需要温和颠倒混匀
	洗脱时间太短	延长洗脱时间、提高洗脱液温度或于 65℃孵育
	低拷贝质粒	得率会因质粒载体拷贝数的差异有明显的波动。低拷贝质粒可增加菌液量，同时比例增加溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的用量。
	大质粒(>10 kb)	应加大菌液使用量，同时按比例增加溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的用量。
	溶液 II 保存不当失效	溶液 II 使用后，应立即盖紧盖子确保密封；使用新鲜配制的 200 mM NaOH，1% SDS 溶液重新提取
	溶液 II 析出	溶液 II 低温时易析出，应 37℃加热至完全溶解，混匀后使用
	菌液保存不当	培养细菌前可先划线或涂布平板活化，以稳定质粒产量
	宿主菌株差异	宿主菌株不同也会影响质粒 DNA 的产量，建议使用 end A-大肠杆菌菌株，如 DH5 α 、TOP10 及 XL10 等
基因组污染	裂解操作不当	加入溶液 II、溶液 III 后，必须温和颠倒混匀；样本裂解时间不要超过 5 min
纯度低	乙醇残留	步骤 9 离心完成后可将吸附柱开盖静置 5-10 min，最大程度去除乙醇。
	盐离子残留	建议添加洗涤液时可沿管壁加入，并盖紧盖子摇晃 2-3 次。
RNA 残留	RNase A 活性下降	已加入 RNase A 的溶液 I 长时间室温放置可能会导致酶活下降，使用后应及时放回 2-8℃
	菌体过多	由于菌体数量过多，导致溶液 I 中 RNase A 不足以消化菌体中的 RNA，建议减少菌液体积





**SERVE SCIENCE
SEE THE FUTURE**

Hangzhou BioEast Biotech. Co., Ltd.

📍 Room 701, Building 3#, Hexiang Technology Center, Hangzhou Biopharma Town

☎ Tel: 0571-86963020

🌐 Web: www.bioeast.com

