



General Plasmid Mini Kit

For purification of plasmid DNA

Research use only

Store at room temperature



目 录

| | |
|-----------------|----|
| 产品介绍 | 3 |
| 产品特点 | 3 |
| 试剂盒应用 | 4 |
| 质粒DNA的应用 | 4 |
| 产品质量控制 | 4 |
| 试剂盒内容 | 5 |
| 储存条件 | 5 |
| 试剂盒组分信息 | 5 |
| 注意事项 | 6 |
| 质粒DNA提取得率 | 7 |
| 质粒DNA内毒素含量 | 7 |
| 操作前准备事项 | 8 |
| 实验材料和设备 | 8 |
| 安全性 | 8 |
| 操作指南 | 9 |
| ● 质粒DNA小提小量操作步骤 | 10 |
| ● 质粒DNA小提中量操作步骤 | 12 |
| DNA浓度及纯度测定 | 13 |
| 快速操作示意图 | 14 |
| 问题分析指南 | 15 |

产品介绍

本公司的核酸提取和纯化系列产品可以从多种来源和复杂成分样本中提取纯化到高质量的核酸。DNA 系列产品基于 DNA-only 硅胶膜纯化柱和独特配方试剂可以从多种样本中纯化得到高质量 DNA。

General Plasmid Mini Kit 采用 DNA-only 纯化柱技术及高效的 SDS 裂解配方，可以在 20 分钟内从细菌中获得高质量的质粒 DNA。DNA-only 纯化柱的质粒 DNA 最大结合能力为 80 μ g DNA，实际提取获得的质粒 DNA 量与菌液体积、质粒拷贝数（高拷贝、低拷贝）、菌株、培养条件等因素相关。

DE-01001 试剂盒可满足 50 次高纯度质粒小量提取、或 45 次小量提取+5 次小提中量提取操作；DE-01002 试剂盒可满足 100 次高纯度质粒小量提取、或 90 次小量提取+10 次小提中量提取操作；DE-01003 试剂盒可满足 250 次高纯度质粒小量提取、或 225 次小量提取+25 次小提中量提取操作。

产品特点

- ◆ 无 RNA 酶污染：无需额外添加 RNA 酶即可去除质粒 DNA 中的 RNA，避免实验室遭受外源 RNA 酶污染。
- ◆ 速度快：质粒 DNA 提取操作在 20 分钟内即可完成。
- ◆ 安全：无需有机试剂抽提。
- ◆ 质量高：提取获得的质粒无 RNA、无 RNA 酶、无内毒素、离子含量极低，能满足各种实验的要求。

试剂盒应用

该试剂盒适用于纯化革兰氏阴性菌中的质粒 DNA。

质粒 DNA 的应用

General Plasmid Mini Kit 纯化获得的质粒 DNA 纯度高，可用于常规分子生物学操作，如：转化、酶切、PCR、文库构建、转染（传代细胞甚至原代细胞转染）、测序（建议使用 ddH₂O 洗脱质粒 DNA）。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的通用质粒提取试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

| General Plasmid Mini Kit 通用质粒小量提取试剂盒 | | | |
|---|----------|----------|----------|
| 试剂盒组成 | DE-01001 | DE-01002 | DE-01003 |
| | | 50 次 | 100 次 |
| Buffer S1 | 10ml | 20ml | 50ml |
| Buffer S2 | 10ml | 20ml | 50ml |
| Buffer S3 | 25ml | 50ml | 125ml |
| Buffer PW | 25ml | 50ml | 125ml |
| Buffer WB2 | 15ml | 30ml | 75ml |
| Buffer EB | 10ml | 20ml | 50ml |
| 离心柱 | 50 个 | 100 个 | 250 个 |
| 收集管 | 50 个 | 100 个 | 250 个 |
| 说明书 | 1 份 | 1 份 | 1 份 |

产品信息

| | | | |
|----------|----------|-------------|-----------------|
| 型号 | 离心柱型 | 纯化组件 | Foregene 离心柱、试剂 |
| 通量 | 1-24 个样品 | 制备时间 | 20min (24 个样品) |
| 离心机 | 台式离心机 | 细菌裂解产物分离 | 离心分离 |
| 离心柱液体盛装量 | 800µl | 纯化柱 DNA 承载量 | 80µg |
| 最小洗脱体积 | 50µl | 菌液处理量 | 1-15ml |

储存条件

本试剂盒在常温(15–25°C)干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于 2–8°C。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer S1: 提供细菌裂解环境。
- ◆ Buffer S2: 裂解细胞，变性蛋白和 DNA。
- ◆ Buffer S3: 沉淀蛋白和基因组 DNA，并提供质粒 DNA 上柱环境。
- ◆ Buffer PW: 去除质粒 DNA 中的蛋白质、RNA 等杂质。
- ◆ Buffer WB: 去除质粒 DNA 中的残留的盐离子。
- ◆ Buffer EB: 洗脱纯化柱膜上的质粒 DNA。
- ◆ DNA-only Column: 特异吸附裂解产物中的质粒 DNA。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 菌液使用量不宜过多。
- ◆ 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer WB2 是否按说明添加了无水乙醇。Buffer WB2 在使用前分别添加 60ml 无水乙醇(DE-01001)、120ml 无水乙醇(DE-01002)、300ml 无水乙醇(DE-01003)。
- ◆ 使用前，仔细检查 Buffer S2 和 Buffer S3 中是否有沉淀析出，若有沉淀析出，请将其置于 37°C 溶解，混匀后再使用。
- ◆ 洗脱体积: 小量提取不应少于 50 μ l，中量提取不应少于 100 μ l，否则会影响质粒 DNA 产量。
- ◆ 所有离心步骤均为使用台式离心机常温(15-25°C)离心。
- ◆ 切记不要在任何 Buffer 中添加 RNA 酶。
- ◆ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行。

质粒 DNA 提取得率

提取的质粒 DNA 量与细菌培养浓度、拷贝数、菌株、培养条件等因素有关。

| 质粒类型 | 培养条件 | 质粒种类 | 得 率 |
|------|--------------|--|----------------|
| 低拷贝 | LB、37°C、16hr | pBR322、pACYC 及其衍生载体、SuperCos、pWE15、pSC101 及其衍生载体 | 1-3µgDNA/ml 菌液 |
| 高拷贝 | LB、37°C、16hr | pcDNA3.1、pBS、pTZ、pGM-T | 5-8µgDNA/ml 菌液 |

质粒 DNA 内毒素含量

内毒素，也称作脂多糖或 LPS，是革兰氏阴性菌的细胞壁组分。在提取质粒过程中的裂解阶段细菌会释放内毒素，它会降低敏感细胞系的转染效率并干扰转染结果。

| 质粒制备方案 内毒素水平 | Plasmid Mini Kit | High Quality Plasmid Mini Kit | 普通试剂盒 | 离子交换柱 | 2×CsCl |
|-----------------|------------------|-------------------------------|-------|-------|--------|
| EU/µg DNA | 2-8 | 1-2 | >100 | 8-10 | 2-4 |

注：菌株：DH5α 质粒：pcDNA3.1

以 Plasmid Mini Kit、High Quality Plasmid Mini Kit、离子交换柱、2×CsCl 和普通试剂盒制备同一批次 DH5α 菌液的 pcDNA3.1 质粒转染原代成纤维细胞，平均转染效率如下：

| | |
|-------------------------------|------|
| Plasmid Mini Kit | 97% |
| High Quality Plasmid Mini Kit | 100% |
| 离子交换柱 | 95% |
| 2× CsCl | 99% |
| 普通试剂盒 | 25% |

注：细胞转染效率以 High Quality Plasmid Mini Kit 提取的质粒作为标准，设为 100%。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。质粒提取试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 培养 16-20hr 的转化细菌 1-15ml。
- ◆ 1.5ml 或 2ml 无菌离心管(Plasmid Mini Kit); 15ml 无菌离心管(Plasmid Mini Kit II)。
- ◆ 无水乙醇。
- ◆ 台式离心机($\geq 16,000\times g$)、移液器、涡旋仪等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。
- ◆ Buffer S2 含有氢氧化钠：腐蚀性，刺激性。
- ◆ Buffer S3 含有乙酸：刺激性。
- ◆ Buffer PW 含有胍盐：变性剂，刺激性。
- ◆ Buffer WB2 含有无水乙醇：易燃。

操作指南

质粒提取试剂盒提供了一种快速处理革兰氏阴性菌样本，纯化质粒 DNA 的方法，请严格按照质粒提取操作步骤进行相关实验。

材料取用说明

- ◆ 小提小量转化菌用量 1-5ml。
- ◆ 小提中量转化菌用量 5-15ml。

预防样本间交叉污染

为了防止取样和纯化过程中出现样本间交叉污染，可以采取以下措施：

- ◆ 取样过程中，应确保每一单独样本均使用的是无污染的取样器材和一次性离心管。
- ◆ 在吸取样本或溶液的时候，应小心轻柔，避免溶液飞溅。
- ◆ 离心管经振荡操作后，应短暂离心，待管口液体移除后再开盖操作。
- ◆ 整个操作过程应戴上手套进行。若出现手套与样品及其溶液接触的情况，应立即进行更换。

操作步骤

小提小量操作步骤

使用前请先在 **Buffer WB2** 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 **1-5ml** 培养 16-20hr 的菌液，加入离心管中，**12,000rpm (~13,400×g)** 离心 **1min**，尽量吸净培养基（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
注意：建议使用 **2ml** 离心管。与 **1.5ml** 离心管相比，采用 **2ml** 离心管，在后续操作中将更容易使细菌沉淀与 **Buffer S1** 混匀。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 **Buffer S1**，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。
2a: 菌液体积 **≤2ml**，向留有菌体沉淀的离心管中加入 **130μl Buffer S1**。
2b: 菌液体积 **>2ml**，向留有菌体沉淀的离心管中加入 **200μl Buffer S1**。
注意：如果有未完全混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。
3. 向离心管中加入 **Buffer S2**，轻柔地上下翻转 **6-8** 次使菌体充分裂解。
3a: 菌液体积 **≤2ml**，向离心管中加入 **130μl Buffer S2**。
3b: 菌液体积 **>2ml**，向离心管中加入 **200μl Buffer S2**。
注意：轻柔地混合。不要剧烈震荡，以免打断基因组 **DNA**，造成提取的质粒中混有基因组 **DNA** 片断。此时菌液应变得黏稠，所用时间不应超过 **5min**，以免质粒受到破坏。菌体不宜过量，否则会造成菌体裂解不完全。
4. 向离心管中加入 **Buffer S3**，立即上下颠倒 **6-8** 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀，室温静置 **1min**。**13,000rpm (~16,000×g)** 离心 **5min**。离心后离心管底部会形成沉淀。
4a: 菌液体积 **≤2ml**，向离心管中加入 **300μl Buffer S3**。
4b: 菌液体积 **>2ml**，向离心管中加入 **450μl Buffer S3**。
注意：**Buffer S3** 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。静置有助于离心后絮状沉淀集中于管底。
5. 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），注意尽量不要吸到沉淀。
注意：如果吸取的上清液中还有微小白色沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。
6. **12,000rpm (~13,400×g)** 离心 **1min**，弃掉收集管中的废液。
7. 向离心柱中加入 **500μl Buffer PW**，**3,000rpm (~900×g)** 低速离心 **1min**。弃掉收集管中的废液。

8. 向离心柱中加入 **700µl Buffer WB2**（请再次检查 Buffer WB2 是否已添加了无水乙醇），12,000rpm(~13,400×g)离心 **1min**，弃掉收集管中的废液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 将离心柱放回收集管中，12,000rpm(~13,400×g)空管离心 **2min**，去掉离心柱中残余的 Buffer WB。

注意：Buffer WB2中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

11. 将离心柱放到一个干净离心管中，向硅胶膜中间位置滴加 **50-100µl Buffer EB**，室温放置 **2min**。12,000 rpm (~13,400×g)离心 **1min** 收集 DNA 溶液。

注意：为了提高DNA 的回收量，可将离心得到的溶液重新加回离心柱中，重复步骤11。洗脱体积不应小于50 µl，体积过少影响质粒DNA产量。

小提中量操作步骤

使用前请先在 **Buffer WB2** 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 **5-15ml** 培养 16-20hr 的菌液，加入离心管中，**12,000rpm**(~13,400×g)离心 **1min**，尽量吸净培养基（如果菌液较多可通过多次离心将菌体收集到离心管中）。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 **600μl Buffer S1**，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

注意：如果有未完全混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入 **600μl Buffer S2**，轻柔地上下翻转 **6-8** 次使菌体充分裂解。

注意：轻柔地混匀。如果剧烈震荡，会打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片断。此时菌液应变得黏稠，操作时间不要超过 **5min**，时间过久质粒会受到破坏。菌体不宜过量，否则会造成菌体裂解不完全。

4. 向离心管中加入 **1.35ml Buffer S3**，立即上下颠倒 **6-8** 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀，室温静置 **1min**。**13,000rpm** (~16,000×g) 离心 **5min**。离心后离心管底部会形成沉淀。

注意：Buffer S3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。静置有助于离心后絮状沉淀集中于管底。

5. 将上清液用移液器转移到离心柱中（将离心柱放入收集管中），注意尽量不要吸到沉淀。

注意：如果吸取的上清液中还有微小白色沉淀，可将其转移至新的离心管中再次离心后取上清，加入离心柱中。离心柱容量为 **800μl**，上清液请分次转移至离心柱，直至上清液全部离心通过离心柱。

6. **12,000rpm**(~13,400×g) 离心 **1min**，弃掉收集管中的废液。
7. 向离心柱中加入 **700μl Buffer PW**，**3,000rpm**(~900×g) 低速离心 **1min**。弃掉收集管中的废液。
8. 向离心柱中加入 **700μl Buffer WB2**（请再次检查 Buffer WB2 是否已添加了无水乙醇），**12,000rpm**(~13,400×g)离心 **1min**，弃掉收集管中的废液。
9. 重复步骤 8 一次。

10. 将离心柱放回收集管中，**12,000rpm**(~13,400×g)空管离心 **2min**，去掉离心柱中残余的 Buffer WB。

注意：Buffer WB2 中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。

11. 将离心柱转移至新的 1.5ml 离心管中，向硅胶膜中间位置滴加 **100-200μl Buffer EB**，室温放置 **2min**。**12,000rpm** (~13,400×g)离心 **1min**，收集 DNA 溶液。

注意：为了提高 DNA 的回收量，可将离心得到的溶液重新加回离心吸附柱中，重复步骤 11。洗脱体积不应小于 **100μl**，体积过少影响质粒 DNA 产量。

DNA 浓度及纯度检测

- ◆ 得到的质粒 DNA 的质量与操作过程中的多种因素有关。DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。
- ◆ DNA 的 OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA。
- ◆ DNA 的 OD260/280 \approx 1.7-1.9。如果洗脱时不使用洗脱缓冲液 Buffer EB，而使用去离子水，比值会偏低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

快速操作示意图



问题分析指南

以下针对质粒提取中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题分析以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail: Tech@foregene.com。

低产量或无 DNA

通常有多种因素会影响质粒 DNA 的产量，包括菌种、质粒、培养条件、操作等等。

1. 培养的细菌没有转化相应的质粒 DNA 或细菌培养条件不正确。
建议：挑选确定含有转化质粒 DNA 的细菌进行培养，并确认细菌培养条件。
2. 细菌保存时间过长。细菌在甘油冻存液中保存时间较长，常会出现质粒丢失的现象。
建议：可以重新划平板，挑取含质粒的单菌落或重新转化细菌。
3. 细菌制备时间过长。
建议：使用新制备的细菌提取质粒 DNA。
4. Buffer S2 出现沉淀。
建议：将 Buffer S2 置于 37°C 溶解，混匀后再使用。
5. Buffer WB2 没有添加无水乙醇。
建议：确认 Buffer WB2 中添加正确体积的无水乙醇。
6. 细菌重悬不彻底或者没有进行细菌重悬。
建议：离心收集的菌体在加入 Buffer S1 后彻底重悬，可以使用移液器反复吹打或涡旋仪彻底打散菌体。采用 2ml 离心管也有助于细菌重悬。
7. 洗脱液没有正确滴加到硅胶膜上。
建议：将洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 2 分钟增加洗脱效率。

提取获得低产量质粒 DNA

1. 菌株本身原因。
建议：使用实验室常用大肠杆菌菌株并确认其培养条件。
2. 低拷贝质粒。
建议：适量增加菌液制备量可一定程度上提高低拷贝质粒 DNA 的提取量。
3. 细菌重悬不彻底。
建议：离心收集的菌体在加入 Buffer S1 后彻底重悬，可以使用移液器反复吹打或

涡旋仪彻底打散菌体。采用 2ml 离心管也有助于细菌重悬。

4. Buffer S2、Buffer S3 析出少量沉淀。

建议：将 Buffer S2、Buffer S3 置于 37°C 溶解，混匀后再使用。

5. 细菌保存时间过长。

建议：使用新制备的细菌提取质粒 DNA。

6. 洗脱液问题

建议：请使用 Buffer EB 进行洗脱；如果使用 ddH₂O 或其他洗脱液，确认洗脱液的 pH 值在 7-8.5 之间。

7. 洗脱液没有正确滴加

建议：请将洗脱液滴加到硅胶膜的正中间，并在室温放置 2 分钟增加洗脱效率。

8. 洗脱液体积太少

建议：请按说明书上要求使用洗脱液进行质粒 DNA 洗脱，最少不要低于 50µl（中量提取不低于 100µl）。

提取获得质粒 DNA 纯度低

1. 质粒 DNA 污染

a. 分析：细菌培养时间过长或细菌生长过度，部分细菌裂解释放基因组 DNA，并降解。

建议：细菌培养时间控制在 16-20hr。

b. 分析：加入 Buffer S2 后剧烈震荡。

建议：加入 Buffer S2 后轻柔混匀。不可剧烈震荡或使用涡旋仪。

c. 分析：裂解时间过长

建议：Buffer S2 加入后立即混匀，裂解时间不要超过 5 分钟。

2. 杂蛋白污染、内毒素污染、RNA 污染

分析：在加入 Buffer S3 离心后，过柱上清液中含有细小的沉淀；没有使用 Buffer PW 洗涤纯化柱；Buffer PW 洗涤纯化柱没有使用正确的离心转速。

建议：尽量使用实验室常见菌株，如 DH5α、JM109、Top10 等；在上清液过柱时尽量保证上清液中无沉淀；务必按说明书规定的离心转速（900×g）进行 Buffer PW 洗涤纯化柱，并且此步骤不能省略。

3. 杂质离子污染

分析：省略了 Buffer WB2 洗涤纯化柱或者只洗涤了一次，导致残留的离子污染。

建议：务必按说明书使用 Buffer WB 洗涤 2 次，以尽量去除残留的离子。

4. RNA 酶污染

分析: **Buffer S1** 中添加了外源的 RNA 酶; **Buffer PW** 洗涤操作不正确, 导致 RNA 酶残留, 影响下游 RNA 实验操作, 如: 体外转录等。

建议: **Foregene** 系列质粒提取试剂盒无需额外添加 RNA 酶即可去除 RNA, **Plasmid Mini Kit** 里面所有试剂均无需添加 RNA 酶; 务必按说明书规定的离心转速 (900×g) 进行 **Buffer PW** 洗涤纯化柱, 并且此步骤不能省略。

5. 乙醇残留

分析: **Buffer WB2** 洗涤纯化柱后, 没有进行空管离心操作。

建议: 按说明书进行正确的空管离心操作。

6. 其他质粒 DNA 污染

分析: 在琼脂糖凝胶电泳出现目的质粒 DNA 外的其他质粒条带, 可能是转化质粒菌株被其他杂菌污染。

建议: 尽量挑取单克隆细菌进行培养; 细菌接种时在无菌环境中进行。

中国·福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

传真: 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

