



质粒小量提取试剂盒

(Plasmid Miniprep Kit)

目录号：**ZP101** 版本：**2025-05-14**

试剂盒内容：

试剂盒组成	ZP101-1 (50 次)	ZP101-2 (100 次)	ZP101-3 (200 次)
RNaseA (10 mg/ml)	150 μl	300 μl	600 μl
平衡液 ZBL	30 ml	60 ml	120 ml
溶液 1	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 2	15 ml	30 ml	60 ml
溶液 3	20 ml	40 ml	80 ml
去蛋白液 W1	30 ml	60 ml	120 ml
漂洗液 W2	15 ml	2×15 ml	2×30 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	15 ml	30 ml
吸附柱	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

储存条件：

本试剂盒在室温(15-25℃)干燥条件下，可保存 1 年；更长时间的保存可置于 2-8℃。若溶液产生沉淀，应在使用前置于 37℃下溶解沉淀。单独包装的 RNase A 在 -20℃可稳定保存 1 年以上。加入 RNase A 后的溶液 1 应置于 2-8℃保存，可稳定

产品简介：

本试剂盒采用碱裂解法裂解抽提细菌质粒，再利用质粒DNA吸附柱在高盐条件下特异性地结合DNA的特性分离纯化质粒。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，高效、专一吸附DNA。本说明书操作步骤适用于从1-5 ml过夜培养的大肠杆菌LB (Luria-Bertani) 培养液中，快速提取多至40 μg纯净的高拷贝质粒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、体外翻译等。

注意事项：请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 按 1：100 的比例向溶液 1 中加入 RNaseA，混匀，置于 2-8℃保存。
- 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液 W2 中加入无水乙醇。
- 使用前请先检查溶液 2 和溶液 3 是否出现浑浊，如有混浊现象，可在 37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
- 注意不要直接接触平衡液 ZBL、溶液 2 和溶液 3，使用后应立即盖紧盖子。
- 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为 12,000 rpm (~13,400×g)。
- 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
- 去蛋白液 W1 可以有效去除残留的蛋白污染，当宿主菌为 endA⁺ (TG1、BL21、HB101、ET12567、JM 系列) 等核酸酶含量较高的菌株时，强烈推荐使用去蛋白液 W1。
- 去蛋白液 W1 可能会影响实验得率，因此如果宿主菌非上述提及的名称，可省略此步骤。

操作步骤：

1. 柱平衡处理：向吸附柱中加入500ul平衡液ZBL，12,000rpm(~13,400×g)离心1min,倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管中。(处理过的柱子尽量在1小时内使用，如果处理时间过长可再次加平衡液ZBL处理)

注：1、此步骤也可在第5步并行操作离心，即提取液加入吸附柱前平衡柱子即可。

2、柱平衡可充分激活硅基质膜，提高得率；平衡好的吸附柱放置时间超过1小时，效果将有所下降，建议再次处理后使用，但不建议处理2次以上。

2. 收集菌体：取1-5 ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12,000 rpm (~13,400×g) 离心1分钟，保留沉淀，尽量吸除上清。(菌液体积大于离心管，可以多次离心将菌体收集到一个离心管中)。

3. 重悬菌体：向留有菌体沉淀的离心管中加入250 μl 溶液1 (请先检查是否已加入RNaseA)，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

注意：如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

4. 裂解菌体：向离心管中加入250 μl 溶液2，温和地上下翻转6—8次使菌体充分裂解。

注意：温和地混合，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。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过5分钟，以免质粒受到破坏。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应适当减少菌体量。

5. 沉淀除杂：向离心管中加入350 μl 溶液3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，即出现白色絮状沉淀。12,000 rpm (~13,400×g)离心10分钟，此时在离心管底部形成沉淀。

注意：溶液3加入后应立即混合，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。

6. 吸附纯化：将上一步收集的上清液用移液器转移到平衡好的吸附柱中 (吸附柱放入收集管中)，注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

7. 可选步骤：向吸附柱中加入500 μl 去蛋白液W1，12,000 rpm (~13,400×g)离心30-60秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

如果宿主菌是 *end A*⁺ 宿主菌 (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。
此步骤可能会影响质粒的得率, 如果宿主菌是 *endA*⁻ 宿主菌 (DH5α, TOP10 等), 这步可省略。

8. 一漂：向吸附柱中加入600 μl 漂洗液W2 (请检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400×g)离心20秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

9. 二漂：向吸附柱中加入500 μl 漂洗液W2，12,000 rpm (~13,400×g)离心20秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

10. 空离：将吸附柱放入收集管中，12,000 rpm (~13,400×g)离心2分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应(酶切、PCR等)实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

11. 洗脱：将吸附柱置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加80-150 μl 洗脱缓冲液TE，室温放置1分钟，12,000 rpm (~13,400×g)离心1分钟将质粒溶液收集到离心管中。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，重复步骤11。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液，应保证其pH值在7.5-8.5范围内(可以用NaOH将水的pH值调到此范围)，pH值低于7.0会降低洗脱效率。

洗脱缓冲液体积不应少于60 μl，体积过小影响回收效率。且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

低拷贝或大质粒(>10 kb)提取

如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10kb的大质粒，应加大菌体使用量，使用5-10 ml 过夜培养物，同时按照比例增加溶液1、2、3的用量，洗脱缓冲TE应在65—70℃水浴预热，吸附和洗脱时可以适当延长时间，以增加提取效率。其它步骤相同。