杭州新景生物试剂开发有限公司
HANGZHOU SIMGEN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.
地址：浙江省杭州市西湖区西园一路8号4幢5F
技术支持：400-0099-857　　邮箱：technical@simgen.cn
电话：0571-87381295　　0571-87381297
传真：0571-87381297　　邮编：310030
网址：www.simgen.cn

快速质粒DNA小量试剂盒说明书
Rapid Plasmid DNA Mini Kit Handbook

8分钟内获得分子生物学级别纯度的质粒DNA

样本用量：1-5 ml细菌培养物

特别增加中和指示剂

纯化柱使用前无需平衡液使用

纯化柱的质粒DNA饱和负载量超过50 μg

仅供科研使用，请勿用于人体及动物的治疗或临床诊断。

版本：2026年11月

目录

产品组成……1
产品储存与有效期……1
用户需自备的试剂与物品……1
技术支持……1
质量保证……1
注意事项……2
产品介绍……2
产品适用的样本范围……2
操作步骤分析与说明……2
起始样本……2
菌体溶解……3
沉淀菌体碎片和基因组 DNA……3
中和指示剂……3
柱纯化技术……3
质粒 DNA 的提取效率和纯度……4
使用前准备……5
操作流程图示……6
操作步骤……7
Protocol……8
常见问题分析……9
回收不到质粒 DNA 或者质粒 DNA 的回收效率低……9
操作步骤中的异常现象……9
酶切失败……10
质粒 DNA 电泳带型异常……11
质粒 DNA 中含有 RNA 污染……11
质粒 DNA 中含有细菌基因组 DNA 污染……11
附录 1：革兰氏阳性细菌质粒 DNA 提取方法……12
附录 2：质粒 DNA 的浓缩与纯化……12
使用 Simgen 快速质粒 DNA 小量试剂盒发表的部分论文……13

产品组成

快速质粒 DNA 小量试剂盒 Cat. No.	5 次制备 1005005	50 次制备 1005050	250 次制备 1005250
核酸纯化柱	5 个	50 个	250 个
2 ml 收集管	5 个	50 个	250 个
RNase A	*	28 µl	140 µl
Buffer I	1.5 ml	14 ml	70 ml
Buffer II	1.5 ml	14 ml	70 ml
Buffer N8	2 ml	20 ml	100 ml
Buffer W2（浓缩液）	2.5 ml	25 ml	65 ml×2
Buffer E	0.6 ml	6 ml	30 ml
说明书	1 份	1 份	1 份

* 5 次制备中的 RNase A 已加入到 Buffer I中。

产品储存与有效期

1. RNase A 可常温运输，收到后请置于 2~8℃储存。加入 RNase A 的 Buffer I 请置于 2~8℃储存，储存时间若超过 6 个月，需重新补加 RNase A。
2. 其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管、移液器及吸头
3. 一次性乳胶手套等防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 可能需要旋涡振荡器
6. 可能需要 Buffer W1（Cat. No. B025-01，详见第 3 页柱纯化技术中的第 2 点“洗涤”内容）

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：微信公众号：Simgen, e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

质量保证

杭州新景生物试剂开发有限公司保证所提供的产品是通过质量检验的合格产品。如果用户在使用中发现产品不能满足实验要求，请立即停止使用产品，并联络我公司技术支持获取帮助；或者直接联络我公司当地经销商，提出产品更换要求。

注意事项

Buffer II和 Buffer N8 均含刺激性化合物，操作时请戴乳胶手套和防护眼镜，避免沾染皮肤、眼睛，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，须立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时请寻求医疗帮助。

产品介绍

快速质粒 DNA 小量试剂盒采用了本公司最新发明的特殊中和液 Buffer N8，可以让用户在 8 分钟内从 1~5 ml 细菌培养物（LB 培养基）中快速提取多至 50 μg 高纯度的质粒 DNA，获得的质粒 DNA 适用于限制性内切酶消化、测序、文库筛选、连接与转化、体外转录与翻译、强壮细胞转染等分子生物学实验。如果提取的质粒 DNA 需要用于较为敏感的细胞转染实验，可单独购买内毒素清除剂（Cat. No. 1050020/1050100）处理提取好的质粒 DNA，也可直接购买无内毒素质粒 DNA 小量试剂盒（Cat. No. 1009050）。

产品适用的样本范围

快速质粒 DNA 小量试剂盒最适合在质粒构建、克隆鉴定、测序等实验中使用，这一类实验通常使用高拷贝质粒，且宿主菌多为 DH5α、TOP10 等内切酶缺陷型（endA-）菌株，从 1~5 ml 的过夜细菌培养物（LB 培养基）中提取质粒 DNA，操作非常简便快速。

快速质粒 DNA 小量试剂盒适合从革兰氏阴性细菌（如大肠杆菌）中分离纯化质粒 DNA。如果需要从革兰氏阳性细菌中分离纯化质粒 DNA，请先用溶菌酶对细菌进行破壁处理，具体步骤请参照第 12 页“附录 1：革兰氏阳性细菌质粒 DNA 提取方法”内容。

操作步骤分析与说明

1. 起始样本

从新鲜培养的平板中挑取一个单克隆菌落，接种到 3-5 ml 含对应抗生素的 LB 培养基中，37℃，200-220 rpm 振荡培养 12-16 小时。注意事项如下：

(1) **不应吸取储存的甘油菌直接进行培养。**长时间储存的甘油菌中的细菌可能已经出现细菌个体间基因型的分化，并混有丢失质粒的细菌。甘油菌必须在含有抗生素的平板上划线筛选，挑选生长良好的单菌落用于接种培养。

(2) **不要挑取多个单克隆菌落到一份液体培养基中培养。**不同单克隆菌落间可能由于存在基因型差异的原因，相互间有生存竞争关系，反而使收获的菌量减少。

(3) **2-8℃冰箱中存放超过 2 周的平板上的菌落已经开始死亡，**不再适合接种培养。

(4) **细菌培养时间不应超过 16 小时。**培养时间超过 16 小时的细菌开始出现溶解现象，可能导致质粒 DNA 的得率降低。

(5) 用于细菌培养的培养基所占容器的体积不应大于 1/4。

(6) 将 LB 培养基中的 NaCl 含量提高到 10 g/L，每毫升 LB 细菌培养物的质粒 DNA 得率能提高 2 μg 左右。

2. 菌体溶解

快速收集的菌体（12000 rpm 离心 30 秒）通常会堆积得比较紧密而不易悬浮，可以改用 3000 rpm 离心 5 分钟收集菌体，以便于后续悬浮步骤的操作。

必须用 Buffer I充分悬浮细菌，未被悬浮分散的细菌不能被碱性的 Buffer II溶解。溶解后的细菌中的质粒 DNA 与基因组 DNA 均泄漏出来，处于变性状态。

菌体溶解物应呈现黏稠的透明状，**如果加入 Buffer II溶菌后液体仍然呈现浑浊状，并且未呈现黏稠的特征，应考虑培养物中有真菌污染的可能性。**

3. 沉淀菌体碎片和基因组 DNA

Buffer N8 会中和 Buffer II中的碱性物质，此时质粒 DNA 将恢复至超螺旋结构并保留在溶液中，大片段的基因组 DNA 则在复性的过程中与菌体碎片缠绕在一起形成沉淀。经过高速离心后基因组 DNA 与菌体碎片聚集到离心管底部，达到与质粒 DNA 分离的目的。

4. 中和指示剂

由于细菌的生长条件或者细菌菌株间的差异，初次使用质粒提取试剂盒的用户通常难以把握最佳的中和效果。本公司的质粒试剂盒产品均已在 Buffer I中加入了中和指示剂，加入 Buffer N8 后翻转离心管时，蓝色沉淀物会逐渐变色，直至完全转变成淡黄色沉淀，此时即可判定是充分中和的状态。

5. 柱纯化技术

1) DNA 结合

将离心获取的含有质粒 DNA 的上清液倒入纯化柱中短时离心数秒，即可使 DNA 吸附到纯化柱的硅胶膜上，残留的蛋白或者抑制下游分子生物学反应的杂质则被过滤除去。

2) 洗涤

Buffer W2 会洗去残留在膜上的盐分及色素，确保纯净的质粒 DNA 吸附在纯化柱上。质粒 DNA 结合、洗涤的过程中只需要使溶液滤过纯化柱即可，因此对离心速度和离心时间并无严格的要求。可以选用离心机中的“short run”或“quick”模式运行以节约操作时间。

纯化柱上可能会残留极其痕量的蛋白，这些痕量的蛋白已经不足以影响通常的分子生物学实验结果。但是从一些野生型的大肠杆菌或者是非限制性内切酶缺陷型（endA+）的宿主菌中提取质粒 DNA 时，残留的痕量蛋白包括了核酸内切酶 I，会干扰后续的酶切反应。此时需在 Buffer W2 洗涤之前增加一次 Buffer W1（需单独订购，Cat. No. B025-01）洗涤，以去除纯化柱上残留的痕量蛋白，即在操作步骤 5 和操作步骤 6 之间增加以下步骤：

弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer W1，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

下表是常见宿主菌的 endA 基因型：

EndA*- Strains of *E. Coli							
DH5α	DH1	DH21	JM106	JM109	SK2267	SRB	XLO
TOP10	DH10B	JM103	JM107	SK1590	MM294	Stbl2™	XL1-Blue
BJ5182	DH20	JM105	JM108	SK1592	Select96™	Stbl4™	XL10-Gold
EndA*+ Strains of *E. Coli							
C600	JM110	RR1	ABLE® C	CJ236	KW251	P2392	BL21(DE3)
HB101	TG1	TB1	ABLE® K	DH12S™	LE392	PR700	BL21(DE3) pLysS
JM101	JM83	TKB1	HMS174	ES1301	M1061	Q358	BMH 71-18
All NM strains				All Y strains			

3) 高速空离

将洗净后的纯化柱放回到 2 ml 收集管中，最高速（≥12000 rpm）空离 1 分钟的作用：

A. 使 Buffer W2 被充分地离心除去。

B. 在丢弃 Buffer W2 滤液的过程中，如果有滤液不慎沾染到纯化柱上，也可被离心除去。

4) 洗脱质粒 DNA

A. 我们推荐使用试剂盒中提供的 Buffer E（5 mM Tris-HCl，pH 7.5）洗脱质粒 DNA，以便于质粒 DNA 的长期稳定储存；也可以用去离子水洗脱 DNA，但是应确保去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

B. 增加用于洗脱质粒 DNA 的 Buffer E 或者去离子水的体积可提高质粒 DNA 的回收效率；减少洗脱体积可增加获得的质粒 DNA 的浓度。**若用于洗脱质粒 DNA 的 Buffer E 或者去离子水的体积太小（比如 20 µl），虽然有可能再提高获得的质粒 DNA 的浓度，但由于洗脱液不能充分润透纯化柱上的膜，会导致获得的质粒 DNA 的总量严重降低。**

C. 预热的 Buffer E 或者去离子水能提高质粒 DNA 的洗脱效率。

D. 将 Buffer E 或者去离子水加入纯化柱后延长静置的时间（延长至 3-5 分钟）能提高质粒 DNA 的洗脱效率。

E. 离心甩干后的纯化柱可直接加入 Buffer E 洗脱质粒 DNA，无需打开纯化柱盖子挥发残留的乙醇，过度干燥的纯化柱不利于质粒 DNA 的洗脱。

F. 为了产品使用的安全，如果离心机没有防泄漏的盖子，我们建议将洗脱质粒 DNA 的条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以防止 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

6. 质粒 DNA 的提取效率和纯度

从每毫升细菌中获取的质粒 DNA 质量数主要取决于菌体中质粒 DNA 的拷贝数，对于高拷贝质粒，通常从 1.5 ml LB 细菌培养物中能获得 5-15 µg 质粒 DNA。如果是低拷贝质

粒或者希望一次性提取更大量的质粒 DNA，我们建议用质粒 DNA 小提中量试剂盒（Cat. No. 1007050）从 15 ml LB 细菌培养物中提取质粒 DNA。

下表是常见质粒的拷贝数：

质粒	Origin of replication	Copy number	Classification
pUC vectors	pMB1	500–700	high copy
pBluescript vectors	ColE1	300–500	high copy
pGEM® vectors	pMB1	300–400	high copy
pTZ vectors	pMB1	>1000	high copy
pBR322 and derivatives	pMB1	15–20	low copy
pACYC and derivatives	p15A	10–12	low copy
pSC101 and derivatives	pSC101	~5	very low copy

当菌液中所含质粒 DNA 充足的前提下，质粒 DNA 提取的限制因素由纯化柱决定。当菌液中的质粒 DNA 小于 30 μg 时，纯化柱可接近 100%的高效吸附质粒 DNA。当菌液中质粒 DNA 高于 30 μg 时，纯化柱仍然能吸附更多的质粒 DNA，但有部分质粒 DNA 会丢失在滤液中。如果再持续地加载质粒 DNA，纯化柱的饱和负载量最高能达到 50 μg 左右（注意当质粒纯化柱吸附的 DNA 达到饱和时，应使用 100 μl 以上的 Buffer E 洗脱质粒 DNA，否则纯化柱上会残留大量质粒 DNA 未被充分洗脱）。

Simgen 质粒纯化柱（Cat. No. 7001050，可单独订购）性能非常稳定，可在常温放置 2 年维持原有的 DNA 吸附能力，使用前无需加平衡液处理。

DNA 的质量通常用测量 260 nm 处的光吸收值进行估算，换算方式为 1 OD 光密度相当于 50 ng/μl 双链 DNA 浓度。DNA 的纯度通常用 A_{260}/A_{280} 进行估算，纯净 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值应该在 1.7-1.9 之间；DNA 的盐分残留度通常用 A_{260}/A_{230} 进行估算，纯净 DNA 的 A_{260}/A_{230} 比值应该在 1.8-2.5 之间。

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 向装有 RNase A 的螺旋盖管中加入 1 ml Buffer I，混匀后再将溶液吸回到装有 Buffer I 的瓶子中，并在标签的方框中打勾做好“RNase A 已加”的标记，置于 2~8℃保存。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer W2 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
4. 当室温低于 15℃时，使用 Buffer II前应先观察试剂是否有白色沉淀产生，如有沉淀则应于 37℃温育直至沉淀完全溶解，颠倒混匀后再使用。

操作流程图示

扫描二维码观看操作视频



离心收集 1-5 ml 过夜培养的细菌

加入 250 µl 已加入 RNase A 的 Buffer I

旋涡振荡或移液器吹打重悬细菌

加入 250 µl Buffer II

温和翻转裂解细菌

加入 350 µl Buffer N8，温和翻转至完全变为黄色沉淀

最高速离心 2 分钟

将上清液滤过核酸纯化柱

加入 800 µl Buffer W2 洗涤

高速空离甩干

加 60~100 µl Buffer E 洗脱质粒 DNA

操作步骤

1. **12000 rpm 离心 30 秒收集 1-5 ml 过夜培养的细菌，弃尽培养基。加入 250 µl 已加入 RNase A 的 Buffer I，充分悬浮沉淀的细菌。**

* 可用旋涡振荡器振荡或用移液器反复吸注的方法悬浮沉淀的细菌块。充分悬浮的细菌呈均一的悬浊液，不应留有可见的小菌块，否则将严重影响最后质粒 DNA 的产量。

2. **加入 250 µl Buffer II，温和并充分地翻转离心管 4-6 次。**

* 使用 Buffer II前确认溶液中没有可见沉淀存在；Buffer II使用完后应盖紧瓶盖，避免与空气长期接触。
* 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
* 当细菌裂解充分时，溶液应呈黏稠的透明状；如果达不到上述效果，可能是细菌用量过多所致，可增加翻转的次数以达到黏稠的透明状。
* 此步骤不应超过 5 分钟。

3. **加入 350 µl Buffer N8，温和并充分地翻转离心管直至溶液中残留的蓝色沉淀全部转变为淡黄色沉淀。**

* 此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
* 当使用的细菌量大于 3 ml，或者已知细菌的浓度较高的前提下，在蓝色沉淀完全转变为黄色沉淀后，应继续温和地翻转 4-6 次，或者翻转至沉淀物开始收缩，变得松散为止。

4. **最高速（≥12000 rpm）离心 2 分钟。**

* 当使用的细菌量大于 3 ml 或者已知细菌的浓度较高的前提下，可延长离心时间至 5 分钟使沉淀物更结实。

5. **将核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中，将步骤 4 中的上清液倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 离心结束后应及时将上清倒入核酸纯化柱，长时间静置可能会导致管底的沉淀浮起，不利于后续的操作。

6. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 800 µl Buffer W2，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 滤液无需彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。
* 如果质粒的宿主菌是野生型大肠杆菌，或者是 BL21、HB101 等 endA+宿主菌，则需在 Buffer W2 洗涤之前增加一次 Buffer W1（需单独订购，Cat. No. B025-01）洗涤，以洗去残留的微量核酸内切酶 I，否则可能会影响后续的酶切效果，具体操作步骤见第 3 页柱纯化技术中的第 2 点“洗涤”内容。
* 确认在 Buffer W2 中已经加入无水乙醇。
* 如果质粒 DNA 用于细胞转染等目的，重复步骤 6 一次可确保获得实验效果更佳的质粒 DNA。

7. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，最高速（≥12000 rpm）离心 1 分钟。**

* 请勿省略此步骤，否则可能因所纯化的质粒中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

8. **弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 60~100 µl Buffer E，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。
* 也可用去离子水洗脱 DNA，但应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

9. **弃核酸纯化柱，洗脱的质粒 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将质粒 DNA 储存于－20℃备用。**

Protocol

1. Harvest 1 - 5 ml overnight cultures of bacteria cells in LB (Luria-Bertani) medium by centrifuging at 12,000 rpm for 30 s, discard the medium. Fully suspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer I with addition of RNase A.

* The pellet could be suspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps left. Otherwise it would seriously affect the final plasmid DNA yield.

2. Add 250 µl Buffer II and mix thoroughly by gently inverting the tube 4 - 6 times.

* Before using Buffer II, make sure that no visible precipitate exists in the solution. After applying Buffer II, tighten the cap to avoid prolonged contact with air.
* Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA.
* The solution should be viscous and slightly clear when the bacterial is lysed sufficiently；if too much bacteria was used, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear.
* Do not allow this step to proceed for more than 5 minutes.

3. Add 350 µl Buffer N8, mix gently and thoroughly by inverting the tube until the color of precipitate changes from blue to light yellow completely.

* Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA.
* Continue to invert gently 4 - 6 times after the color of precipitate changes from blue to light yellow completely if the bacteria culture medium used was more than 3 ml.

4. Centrifuge at full speed (≥12,000 rpm) for 2 min.

* Prolong the centrifuge time to 5 min if more than 3 ml bacteria culture medium was used.

5. Place a spin column in a 2 ml collection tube (provided), transfer the supernatant into the spin column, close the lid and centrifuge at 12,000 rpm for 30 s.

* Transfer the supernatant into the spin column immediately after centrifugation, stay for a long time may cause the precipitate to float, which makes it hard to operate in following procedure.

6. Discard the filtrate. Place the spin column back to the collection tube. Add 800 µl Buffer W2 to the spin column. Closed the lid and centrifuge at 12,000 rpm for 30 s.

* Repeat step 6 is recommend to ensure high quality of plasmid, if plasmid will be used for cell transfection.
* Ensure ethanol has been added into Buffer W2.
* For endA+ host bacteria (e.g. wild-type E.coli, HB101, BL21), washing the spin column by adding Buffer W1 (Order separately, Cat. No. B025-01) is necessary to remove trace nuclease activity. Buffer W1 is not provided, can be purchased from Simgen separately.

7. Discard the filtrate. Place the spin column back to the collection tube. Centrifuge at full speed (≥12,000 rpm) for 1 min.

* Do not omit this step, as this will cause problems in downstream applications due to the residual ethanol in the eluate.

8. Discard the collection tube and place the spin column in a new 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 60~100 µl Buffer E to the center of the column, close the lid, let stand for 1 min, and centrifuge at 12,000 rpm for 30 s.

* The deionized water can also be used to elute the DNA, but the pH should be ensured at 7.0 - 8.5, otherwise it may affect the elution efficiency.

9. Discard the spin column. Eluted DNA can be used for a variety of molecular biology experiments or store at -20°C for later use.

常见问题分析

1. 回收不到质粒 DNA 或者质粒 DNA 的回收效率低

可能的原因：

1) Buffer W2 中未加入无水乙醇，应按比例补加无水乙醇。如果是错误地加入了其他试剂（例如 70%乙醇等），请向我公司技术部寻求帮助。
2) 细菌培养物中污染有真菌。由于抗生素只对细菌起作用，对真菌无效，因此质粒转化、细菌涂布及接种等实验在条件具备的前提下，必须在无菌超净台中，靠近酒精灯火焰周围进行操作。若无超净台，则必须在点燃的酒精灯火焰的 5~10 cm 周围处进行实验。不能直接在实验室环境下操作，否则可能会出现真菌污染。
3) 宿主菌中的质粒缺失或有其他杂菌污染。确保从新鲜制备的含抗生素的平板中挑取单克隆菌落接种培养，并确保在培养基中加入对应的抗生素，不要吸取储存的甘油菌直接进行细菌培养。具体参考第 2 页“起始样本”内容。
4) 提取的是低拷贝质粒。质粒拷贝数的差异会造成产量明显的波动，提取低拷贝质粒时可适当提高菌液用量，并按比例增加 Buffer I、Buffer II和 Buffer N8 的用量，或者直接选择质粒 DNA 小提中量试剂盒（Cat. No. 1007050）。
5) 菌体未悬浮充分，残留有小菌块。菌体未悬浮充分前勿加入 Buffer II。
6) 细菌用量过多。细菌用量过多会导致裂解不充分、菌体沉淀过大、上清液体积减少等问题，严重降低质粒产量，请按说明书要求使用合适体积的菌液。
7) 细菌培养浓度太低。不同宿主菌的差异或者培养条件等因素导致细菌生长缓慢，浓度偏低，即使收集 5 ml 菌液，得到的细菌量也极低。可以适当提高菌液用量；建议使用 DH5α、TOP10 及 JM109 等 endA-大肠杆菌菌株，培养方法及条件请参考第 2 页“起始样本”内容。
8) Buffer II有白色沉淀产生。若有沉淀则应将 Buffer II置于 37℃温育直至沉淀完全溶解，颠倒混匀后再使用。
9) Buffer II使用完后未盖紧瓶盖，与空气长期接触导致溶菌效率下降。请制备新的 Buffer II：1% SDS，0.2 M NaOH。
10) DNA 的洗脱效率差。参考第 4 页柱纯化技术中的第 4 点“洗脱质粒 DNA”内容优化 DNA 的洗脱方案。
11) 质粒上插入的基因的表达产物对细菌有毒性，影响了细菌的正常生长。

2. 操作步骤中的异常现象

1) 细菌沉积在管底，难以用旋涡振荡充分悬浮。如果要收集超过 5 ml 细菌培养物，却仍然使用快速收集菌体（12000 rpm 离心 30 秒）的方法，可能会导致收集的菌

体难以悬浮，此时可尝试用移液器吸头吹打菌体沉淀的方法悬浮细菌；或者改为3000 rpm 离心 5 分钟收集菌体。

2) 加入 Buffer II后，溶液变得非常黏稠，无法流动。通常造成上述现象的原因是细菌用量过多，请适当减少细菌用量。

3) 加入 Buffer II后，溶液未呈现黏稠的半透明状，而是维持细菌在 Buffer I中的浑浊状，无黏滞感。上述现象通常是因为细菌培养物中污染了大量的真菌或者革兰氏阳性细菌等不能被 Buffer II所溶解的微生物。应确保从新鲜制备的含抗生素的平板中挑取单克隆菌落接种培养，而非用甘油菌直接进行培养。

4) 离心后沉淀不能沉积到管底，呈膨胀物的形式悬浮在液体中。通常是由于加入 Buffer N8 后未充分中和或者是细菌浓度太高所致，请翻转离心管 10 次后再次离心。

5) 离心后上清液呈现淡黄色，沉淀没有沉积到管底而是聚在管壁上。这种情况通常是由于细菌用量太少导致，可继续进行后续操作，不会影响质粒得率和纯度。

6) 质粒 DNA 上样电泳时，加入上样孔的 DNA 溶液不能下沉，反而上浮飘散开来。通常是因为高速空离步骤没有操作，洗脱的质粒 DNA 中乙醇含量过多所致。

3. 酶切失败

1) 限制性酶切后电泳检测发现质粒消失，没有条带，或者条带出现严重的拖尾现象。

A. 可能是选用了野生型的或者是 endA+的宿主菌且未用 Buffer W1 洗涤纯化柱所致。请确认所用宿主菌的类型，野生型或 endA+型的确保用 Buffer W1 洗涤纯化柱，具体操作步骤见第 3 页柱纯化技术中的第 2 点“洗涤”内容。已提取好的质粒 DNA 可按第 12 页附录 2 中的方法做进一步的纯化。

B. 电泳槽中的电泳缓冲液多次使用未更换，导致缓冲能力降低，容易激活酶切后残留的限制性内切酶的星活性。请按时更换新配制的电泳缓冲液。

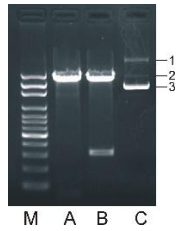
C. 酶切产物应选用含 SDS 的 Loading Buffer（一般限制性内切酶产品中有配套提供），SDS 可灭活残留的限制性内切酶，确保上样、电泳的过程中 DNA 带型不发生改变。

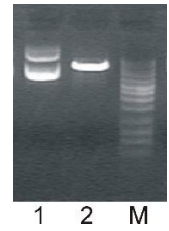
2) 酶切不能完全切开。（推荐使用高酶活力的 Simgen MinuteCut 快速内切酶系列产品。）

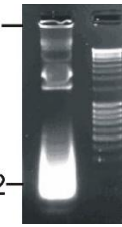
A. 可能是质粒 DNA 浓度过高，应尝试减少质粒 DNA 的用量，或者增加限制性内切酶的用量，并适当延长酶切时间。

B. 可能是没有操作高速空离步骤，导致洗脱的质粒中含有过多乙醇，可尝试减少质粒 DNA 的用量以减少乙醇的抑制效应。若还是不能完全切开，可按第 12 页附录 2 中的方法对质粒 DNA 进行纯化。

4. 质粒 DNA 电泳带型异常

图一 

图二 

图三 

1) 正常的质粒 DNA 带型，见图 1:

C 泳道：空载体 pUC19 电泳效果。顶部条带 1：二聚体质粒 DNA；中间条带 2：含切口的质粒 DNA；下部条带 3：超螺旋质粒 DNA。

A 泳道：空载体 pUC19 单酶切电泳效果。

B 泳道：含插入片段的 pUC19 双酶切电泳效果。

2) 异常的质粒 DNA 带型，见图 2：

获得的质粒 DNA 二聚体含量很高，或者提取的质粒 DNA 于 - 20℃储存一段时间后二聚体增多（见图 2 泳道 1）。质粒二聚体或者多聚体含量的增多与质粒 DNA 本身的结构，以及选择的宿主菌都有关系，但是质粒二聚体或者多聚体的存在并不影响质粒 DNA 酶切的电泳带型（见图 2 泳道 2）。用 TE Buffer（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）替代 Buffer E 或去离子水洗脱质粒 DNA 有助于减少储存过程中质粒二聚体的产生。

5. 质粒 DNA 中含有 RNA 污染（图 3 条带 2 指示位置）

可能的原因：

1) Buffer I中所含的 RNase A 活性降低。如果加入 RNase A 的 Buffer I在 2~8℃保存的时间超过 6 个月的，应重新补加 RNase A。
2) 菌液量过多或者细菌本身特性导致 RNA 含量过多，不能完全被 RNase A 降解。可以增加 Buffer I中 RNase A 的浓度或减少细菌用量。
3) 冬季环境温度低，会导致 RNase A 活性降低。可在中和步骤（操作步骤 3）后将中和产物放置到 37℃温育 5-15 分钟后再进入下一步的离心操作，以提高 RNase A 的消化效率。

6. 质粒 DNA 中含有细菌基因组 DNA 污染

可能的原因：

1） 溶解步骤操作太剧烈：加入 Buffer II后应温和地翻转离心管使细菌溶解。
2） 溶解步骤停留时间过长：加入 Buffer II后静置时间不应超过 5 分钟。
3） 中和步骤操作太剧烈：加入 Buffer N8 后应温和地翻转离心管使溶液中和。
4） 细菌的培养时间超过 16 小时，导致部分细菌出现了溶菌现象。
5） 细菌不是新鲜收集的或者收集好后在冰箱放置时间过久。

附录 1：革兰氏阳性细菌质粒 DNA 提取方法

1．12000 rpm 离心 30 秒收集 1-5 ml 过夜培养的细菌，弃尽培养基。加入 50 µl 无菌水，充分悬浮沉淀的细菌。

* 某些二价阳离子会抑制溶菌酶的活性，如果细菌培养基中含有二价阳离子（如 MRS 培养基等），应在离心收集细菌后增加一次洗涤步骤：加入 1 ml 无菌水，旋涡振荡悬浮细菌后 12000 rpm 离心 30 秒，弃上清，再加入 50 µl 无菌水，旋涡振荡充分悬浮细菌。

* 某些特殊细菌培养后会改变培养基 pH 值（如乳酸杆菌），会抑制溶菌酶的活性，在离心收集细菌后也需要洗涤一次，方法同上。

2．加入 50 µl 溶菌酶溶液（100 mg/ml，Cat. No. 8009100），旋涡振荡约 15 秒混匀，37°C温育 30-60 分钟。

* 大部分细菌水浴 30 分钟后已经充分破壁，但是某些细胞壁较厚的细菌（比如金黄色葡萄球菌）需要处理 1-3 小时才能完全破壁。请根据不同类别的细菌适当调整水浴时间。

3．加入 150 µl 已加入 RNase A 的 Buffer I，温和地翻转离心管 4-6 次。后续操作接试剂盒的操作步骤 2 即可。

附录 2：质粒 DNA 的浓缩与纯化

注意：用于浓缩或纯化的质粒 DNA 的质量不应超过 30 µg！

本方法适用的质粒 DNA 样本：

A. 传统碱裂解酚氯仿法收获的质粒 DNA 的进一步纯化。可去除残留的蛋白（图 3 中 1 指示部分）和降解的 RNA（图 3 中 2 指示部分）

B. 浓度低的质粒 DNA（如低拷贝质粒）溶液的浓缩。

C. 怀疑含有非限制性内切酶污染的质粒 DNA 溶液。

D. 怀疑提取的质粒 DNA 中含有酶切抑制物（醇、酚、盐分等），需要做进一步纯化的质粒 DNA 溶液。

1．向需要纯化或浓缩的质粒 DNA 溶液中加入 5 倍体积的 Buffer W1（需单独订购，Cat. No. B025-01），勿弃吸头，直接吸打几次混匀。将混合液转移到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 例如需要纯化 100 µl 质粒 DNA，则需要加入 500 µl Buffer W1。

2．弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 700 µl Buffer W2，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

* 确认在 Buffer W2（Cat. No. B026-01）中已经加入无水乙醇。

3．弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，最高速（≥12000 rpm）离心 1 分钟。

* 此步骤高速空离是为了去尽残留的乙醇，请勿省略，否则可能因所纯化的质粒中残留有乙醇而影响后续的实验效果。

4．弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 60-100 µl Buffer E，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

* 也可用去离子水洗脱 DNA，但应确保所使用的去离子水的 pH 在 7.0-8.5，否则将影响 DNA 的洗脱效率。

5．弃核酸纯化柱，洗脱的质粒 DNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将质粒 DNA 储存于－20℃备用。

使用 Simgen 快速质粒 DNA 小量试剂盒发表的部分论文

1. Liu Y, Lou G, Wu W, et al. Involvement of the NF-κB pathway in multidrug resistance induced by HBx in a hepatoma cell line[J]. Journal of viral hepatitis, 2011, 18(10): e439-e446.
2. Ringle M, Khatri Y, Josef Zapp, et al. Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based Escherichia coli whole-cell bioconversions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(17):7741-7754.
3. Zhang G , Wu Y , Muhammad Z , et al. cDNA cloning, prokaryotic expression and functional analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) in Pogostemon cablin[J]. Protein Expression and Purification, 2019, 163(C):105454-105454.
4. Wang P, Jia X, Xiao X, et al. An Early Diagnostic Clue for COL18A1- and LAMA1-Associated Diseases: High Myopia With Alopecia Areata in the Cranial Midline[J].Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9:644947.
5. Li X, Cao X, Li J, et al. Genome-wide characterization of C2H2 zinc-finger gene family provides insight into the mechanisms and evolution of the dehydration–rehydration responses in Physcomitrium and Arabidopsis[J]. Frontiers in plant science, 2022, 13: 953459.
6. Dou W, Xie J, Chen J, et al. Overexpression of adrenomedullin (ADM) alleviates the senescence of human dental pulp stem cells by regulating the miR-152/CCNA2 pathway[J]. Cell Cycle, 2023, 22(5): 565-579.
7. Tong P, Liao G, Lu D, et al. ZjHXK5 and ZjHXK6 negatively regulate the sugar metabolism of Ziziphus jujuba Mill[J]. Frontiers in plant science, 2024, 15: 1335120.
8. Shi D, Li N, Fan C, et al. Case Report: A 3’splice site variation in RORB exon 3 associated with idiopathic generalized epilepsy in a child[J]. Frontiers in Genetics, 2025, 15: 1508922.