

实验准备注意事项:

将 RNase A 溶液加入 Buffer P1 并混匀。加入 RNase A 后的 Buffer P1 需在 2–8°C 保存。

可选: 将 LyseBlue 以 1:1000 的比例加入 Buffer P1。

将 Buffer P3 置于 4°C 预冷。检测 Buffer P2 中是否有 SDS 沉淀，如果有需将 Buffer P2 置于温浴使沉淀溶解。

用户需自备异丙醇和 70%乙醇。

符号: ●后的数值表示 QIAGEN Plasmid Mini Kit 中相应试剂用量; ▲表示 QIAGEN Plasmid Midi Kit; ■表示 QIAGEN Plasmid Maxi Kit。

表一: 各试剂盒推荐的 LB 培养液体积

Kit	High-copy plasmid	Low-copy plasmid
QIAGEN Plasmid Mini	3 ml	Not recommended
QIAGEN Plasmid Midi	25 ml	100 ml
QIAGEN Plasmid Maxi	100 ml	500 ml

1. 将培养过夜的菌液 4°C , 6000 × g 离心 15 min, 收集细菌。
2. 用●0.3ml, ▲4 ml, ■10ml Buffer P1 重悬细菌。
3. 加入 ●0.3ml, ▲4 ml, ■10ml Buffer P2, 迅速颠倒 4-6 次以充分混匀, 然后室温 (15-25°C) 孵育 5min。如果使用了 LyseBlue 试剂, 溶液会变成蓝色。
4. 加入●0.3ml, ▲4 ml, ■10ml Buffer P3, 迅速颠倒 4-6 次以充分混匀, 然后冰浴●5 min, ▲15 min, ■ 20 min。如果使用了 LyseBlue 试剂, 请注意溶液重新变成无色可作为混匀充分的标志。
5. ●: 4°C , 14,000-18,000 × g 离心 10 min。如果上清液混浊, 请再次离心。
▲和■: 4°C , 大于 20,000 × g 离心 30 min。如果上清液混浊, 请以 4°C , 大于 20,000 × g 再离心 15 min。
6. 将●1 ml, ▲4ml, ■10ml Buffer QBT 加入 QIAGEN-tip ●20, ▲100, ■500, 待液体自然流干以平衡吸附柱。
7. 将步骤 5 中的上清液加入 QIAGEN-tip, 待液体自然流干。
8. 用●2×2 ml, ▲2×10 ml, ■2×30 ml Buffer QC 洗涤 QIAGEN-tip。Buffer QC 必须通过重力自然流过 QIAGEN-tip。
9. 以●0.8 ml, ▲5 ml, ■15 ml Buffer QF 将 DNA 洗脱至一个干净的●2 ml, ▲15 ml, ■ 50 ml 离心管中。如果产物大于 45kb, 将 Buffer QF 预热至 65°C 可提高得率。
10. 沉淀 DNA 通过添加 ●0.56mL, ▲3.5mL, ■10.5ml (0.7 体积) 室温的异丙醇到洗脱的 DNA 中并混合。4° C, ≥15000 x g 离心 30 分钟, 小心地倾到上清液。
11. 用●1 ml, ▲ 2 ml, ■ 5 ml 室温的 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀, 然后用大于 15,000 × g 速度离心 10 min。小心吸去上清。
12. 将沉淀空气干燥 5-10 min, 并以合适的体积和溶液 (如 pH 8.0 的 TE 或 pH8.5 , 10 mM 的 Tris. Cl) 溶解 DNA。