



PurePlasmid Mini Kit

高纯度质粒小提试剂盒

目录号：CW0500M

保存条件：室温 (15-30°C)

产品内容

Component	CW0500M 200 preps
Buffer P1	60 mL
Buffer P2	60 mL
Buffer N3	80 mL
Buffer PB	35 mL
Buffer PW (concentrate)	25 mL
Buffer EB	30 mL
RNase A (10 mg/mL)	600 µL
Spin Columns DM with Collection Tubes	200

产品简介

本试剂盒适合提取1-5 mL菌液, 在碱裂解法裂解细胞的基础上, 采用独特的硅基质膜吸附技术和试剂配方, 通过离心吸附柱在高盐状态下高效专一的结合溶液中的质粒DNA, 每个吸附柱最高可吸附30 μg 的质粒DNA, 并最大限度的去除蛋白质、基因组、RNA和其他杂质。得到的质粒DNA可直接用于细胞转染、PCR、酶切、测序、连接等生物学实验。

自备试剂: 无水乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 加入RNaseA的Buffer P1 置于2-8 $^{\circ}\text{C}$ 可稳定保存6个月。
2. 第一次使用前, 将RNaseA溶液全部加入到Buffer P1中, 混匀, 置于2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 使用前需在室温中放置一段时间, 恢复至室温后使用。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer PW中加入无水乙醇。
4. 使用前若发现Buffer P2、Buffer N3、Buffer PB有沉淀, 可在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴几分钟, 即可恢复澄清 (请勿剧烈晃动Buffer P2)。
5. 注意不要直接接触Buffer P2、Buffer N3和 Buffer PB, 使用后应立即盖紧盖子。
6. 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。

操作步骤

1. 取1-5 mL过夜培养的菌液加入离心管 (自备) 中, 13,000 rpm (~16,200 $\times g$) 离心30秒收集菌体沉淀, 尽量吸弃上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入250 μL Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A), 使用移液器或涡旋振荡器充分混匀, 悬浮菌体沉淀。

注意: 如果菌块未彻底混匀, 将会影响裂解效果, 导致提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入250 μL Buffer P2, 温和地上下颠倒混匀4-6次, 充分混匀使菌体裂解, 此时溶液应变得清亮粘稠。

注意: 温和混匀, 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片段。此步骤所用时间应不超过5分钟, 避免质粒受到破坏。

4. 向离心管中加入350 μL Buffer N3, 立即温和地上下颠倒混匀8-10次, 充分混匀, 此时应出现白色絮状沉淀。13,000 rpm离心5分钟。

注意: Buffer N3加入后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。

5. 将步骤4中所得的上清液转移到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中, 13,000 rpm离心30秒钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入150 μL Buffer PB, 13,000 rpm离心30秒。

7. 向吸附柱中加入400 μL Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 13,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液。

8. 13,000 rpm离心2分钟, 除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。

注意: 倒弃收集管内液体后再离心, 乙醇残留会影响质粒的质量, 并可能产生点胶过程中胶孔飘移现象。

9. 将吸附柱置于一个新的离心管 (自备) 中, 向吸附膜的中间部位加入50-100 μL Buffer EB, 室温放置2分钟, 13,000 rpm离心1分钟, 将质粒溶液收集到离心管中, -20°C 保存质粒。

注意: 1) 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 室温放置2分钟, 13,000 rpm离心1分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或 >10 kb时, Buffer EB在 $65-70^{\circ}\text{C}$ 水浴预热, 可以增加提取效率。