



# GoldHi Plasmid Mini Kit

## 金牌超量质粒小提试剂盒

目录号：CW2108M (200 preps)

保存条件：室温 (15-30°C)

### 产品内容

Component	CW2108M 200 preps
Buffer P1	60 ml
Buffer P2	60 ml
Buffer E3	60 ml
Buffer PW (concentrate)	25 ml
Buffer EB	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	600 $\mu$ l
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，通过新型硅基质膜高效专一的结合质粒DNA，每个吸附柱最高可吸附40 µg的质粒DNA，同时采用特殊的缓冲液系统，有效去除蛋白等杂质。由本试剂盒所得质粒的得率和纯度均较高，且质量稳定，适用于细胞转染、DNA测序、PCR、基于PCR的突变、体外转录、转化细菌、内切酶消化等下游实验。

**自备试剂：**无水乙醇、异丙醇。

## 实验前准备及重要注意事项

1. 所有组分可在干燥、室温（15-30℃）环境稳定保存1年，将吸附柱置于2-8℃可保存更长时间，加入RNase A的Buffer P1 置于2-8℃可稳定保存6个月。
2. Buffer P1在使用前先加入RNase A（将试剂盒中提供的RNase A 全部加入），混匀，置于2-8℃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. 使用前请先检查Buffer P2 和Buffer E3是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀现象，可在37℃水浴几分钟，即可恢复澄清。
5. 注意Buffer P2和Buffer E3含有刺激性物质，请戴手套操作，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。
7. 吸附柱（Spin Columns DM）的最大容积为750 µl，如果样品体积大于750 µl可分批加入。

## 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×g）离心1分钟收集细菌，尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入200 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，悬浮细菌沉淀。

**注意：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，使提取量和纯度偏低。**

3. 向离心管中加入200 μl Buffer P2，温和地上下颠倒混匀8-10次，使菌体充分裂解。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。如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量或者按比例增加P1、P2、E3和异丙醇用量。**

4. 向离心管中加入200 μl Buffer E3，立即上下颠倒混匀8-10次，此时出现白色絮状沉淀。13,000 rpm离心5分钟。

**注意：Buffer E3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。**

5. 向已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中加入260 μl 异丙醇后，立即加入步骤4收集到的上清液，上下颠倒混匀。

**注意：加入异丙醇后应立即加入上清并混匀，避免异丙醇久放后滴入收集管。吸附柱的最大容积为750 μl，若样品体积大于750 μl，可将异丙醇和上清液收集在离心管（自备）中混匀，分批过柱。**

6. 13,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
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. 将吸附柱置于一个新的收集管中，向吸附膜的中间部位加入50-100 μl Buffer EB，13,000 rpm离心1分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20℃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2-5分钟，13,000 rpm离心2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℃水浴预热，可以增加提取效率。**