

Plasmid Mini Kit

质粒小提试剂盒

Cat. No. CW0511

保存：室温

组分说明

Cat. No.	CW0511C	CW0511A
Kit Size	100	200
Buffer P1	30 ml	60 ml
Buffer P2	30 ml	60 ml
Buffer N3	40 ml	80 ml
Buffer PS	30 ml	60 ml
Buffer PW (concentrate)	25 ml	50 ml
Buffer EB	10 ml	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	300 μ l	600 μ l
Spin Column CM	100	200
Collection Tube (2 ml)	100	200

产品简介

本试剂盒提供一种简单快捷提取质粒的方法，快速获得大量的质粒DNA。采用碱裂解法裂解细胞，新型硅基质膜高效专一性结合质粒DNA，独特的缓冲液系统洗去杂质，无需酚抽提和乙醇沉淀。本试剂盒在保证提取量和纯度的前提下，大大简化提取步骤，可从1-5 ml菌液中纯化多达30 μ g的高拷贝质粒DNA。得到的DNA可直接用于PCR、酶切、测序、转化等生物学实验。

注意事项

1. 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。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer PW 中加入无水乙醇。
3. 使用前请检查 Buffer P2、Buffer N3 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在 37℃水浴几分钟，即可恢复澄清。
4. 注意不要直接接触 Buffer P2 和 Buffer N3，使用后应立即盖紧盖子。
5. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
6. 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心。

自备：无水乙醇，离心管

操作步骤

1. 取**1-5 ml**过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，**12,000 rpm**（ $\sim 13,400\times g$ ）离心1分钟，尽量吸弃上清。

注意：如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10 kb的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加Buffer P1、P2、N3的用量；洗脱缓冲液推荐在65~70°C水浴中预热；可以适当延长吸附和洗脱时间，以提高提取效率。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入**250 μ l Buffer P1**（使用前请先检查是否已加入**RNase A**），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

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**250 μ l Buffer P2**，温和地上下颠倒混匀4-6次，使菌体充分裂解，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。

注意：不要剧烈震荡，以免造成所提质粒中出现基因组DNA污染。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。

4. 向离心管中加入**350 μ l Buffer N3**，立即温和地上下颠倒混匀4-6次，此时将出现白色絮状沉淀，**12,000 rpm**离心10分钟，此时在离心管底部形成沉淀。

注意：Buffer N3加入后应立即充分混匀，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。

5. 柱平衡：向已装入收集管（Collection Tube）的吸附柱（Spin Column CM）中加入**200 μ l Buffer PS**，**12,000 rpm**离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

6. 将步骤4中所得上清加入到已装入收集管的吸附柱中，注意不要吸出沉淀，**12,000 rpm**离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

7. 向收集管中加入**600 μ l Buffer PW**（请先检查是否已加入**无水乙醇**），**12,000 rpm**离心1分钟，倒掉收集管中的废液。

8. 重复步骤7。

9. 将吸附柱重新放回收集管中，**12,000 rpm**离心1分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。

10. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加**50-100 μ l Buffer EB**，室温放置数分钟，**12,000 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，重复步骤10。Buffer EB在65-70°C水浴预热，适当延长吸附和洗脱时间，可以增加提取效率。

2）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7.0-8.5（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50 μ l，体积过小会影响回收效率。

3）如果使用TE洗脱，需要考虑其中含有的EDTA是否会影响后续的酶促反应。