



版本号：202503V01

## PurePlasmid Mini Kit

### 高纯度质粒小提试剂盒

Cat.No. CW0500M

#### 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  $\mu$ g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。

#### 保存条件

室温 (15-30°C)

#### 产品内容

| Component                             | CW0500M<br>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 $\mu$ L          |
| Spin Columns DM with Collection Tubes | 200                  |

## 自备试剂

无水乙醇。

## 实验前准备及重要注意事项

1. 第一次使用前, 将RNaseA溶液全部加入到Buffer P1中, 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。
2. 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。
3. 使用前若发现Buffer P2、Buffer N3、Buffer PB有沉淀, 可在37℃水浴几分钟, 即可恢复澄清 (请勿剧烈晃动Buffer P2)。
4. 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。
5. 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×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  $\mu$ L 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  $\mu$ L Buffer PB, 13,000 rpm离心30秒。
7. 向吸附柱中加入400  $\mu$ L 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样现象。

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  $\mu$ L 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,  $-20^{\circ}\text{C}$ 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。