



SuperPlasmid Mini Kit

高效质粒小提试剂盒 (1-5mL)

Cat. No. CW2109

产品简介

本试剂盒提供一种简单、快捷、高效提取质粒的方法，适用1-5mL菌液，将经典的碱裂解法和新型硅基质膜纯化的方式高效结合，30分钟内快速提取，每个吸附柱最高可吸附40 μ g的质粒DNA，有效去除蛋白质、RNA和其他杂质污染，操作简单方便。由本试剂盒所得质粒纯度高、质量稳定，可直接用于细胞转染、PCR、酶切、测序、连接等生物学实验。

储存条件：

康为世纪高效质粒小提试剂盒所有组分可在干燥、室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 环境稳定保存1年，将吸附柱置于2-8 $^{\circ}$ C可保存更长时间。加入RNase A后 Buffer P1置于2-8 $^{\circ}$ C保存，可长期保存6个月。

产品内容

Component	CW2109S 50preps	CW2109M 200preps
Buffer P1	15mL	60mL
Buffer P2	15mL	60mL
Buffer E3	15mL	60mL
Buffer PS	15mL	60mL
Buffer PW (concentrate)	10mL	40mL
Buffer EB	10mL	30mL
RNase A (10 mg/mL)	150 μ L	600 μ L
Spin Columns DM with Collection Tubes	50	200

自备试剂

无水乙醇、异丙醇。

注意事项

1. 第一次使用前, 将RNase A溶液全部加入到Buffer P1中, 混匀, 置于2-8°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。
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°C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 E3和Buffer PS, 具有刺激性, 使用时请带手套, 使用后应立即盖紧盖子。

操作步骤

1. 取1-5mL过夜培养的菌液, 加入离心管(自备)中, 13,000rpm (~16,200×g) 离心30秒收集细菌, 尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入250 μ L 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250 μ L Buffer P2, 温和地上下颠倒混匀8-10次, 使菌体充分裂解, 室温放置3-5分钟。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(此步骤不超过5分钟)。
4. 向离心管中加入250 μ L Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8-10次, 此时出现白色絮状沉淀, 室温放置5分钟。13,000rpm离心5分钟, 吸取上清收集在离心管(自备)中。
注意: Buffer E3 加入后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。
5. 加入0.3倍上清体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。
6. 柱平衡步骤: 向已装入收集管的吸附柱(Spin Columns DM)中加入200 μ L Buffer PS, 13,000rpm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. 将步骤5中滤液与异丙醇的混合溶液转移到吸附柱(已装入收集管)中。
8. 13,000rpm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。
注意: 吸附柱的最大容积为750 μ L, 如果样品体积大于750 μ L可分批加入。

9. 向吸附柱中加入750 μ L Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 13,000rpm 离心1分钟, 倒掉收集管中的废液。

10. 将吸附柱重新放回收集管中, 13,000rpm离心1分钟。

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

11. 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 μ L Buffer EB, 室温放置2-5分钟, 13,000rpm离心2分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。-20 $^{\circ}$ 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2-5分钟, 13,000rpm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 $^{\circ}$ C水浴预热, 可以增加提取效率。

附不同类型质粒提取产量对照表

质粒DNA的产量和质量取决于许多因素, 包括质粒拷贝数、插入片段大小、宿主菌株、培养体积、培养基和试剂盒的结合能力。每个质粒的拷贝类型不同, 其相关拷贝数与预期产量也不同。5mL过夜培养菌液与预期产量如下表所示:

质粒	质粒类型	拷贝数	预期产量
pUC载体	高拷贝	500-700	15-25 μ g
pBluescript载体	高拷贝	300-500	10-18 μ g
pGM载体	高拷贝	300-400	10-20 μ g
pBR322载体	低拷贝	15-20	1-2 μ g
PACYC及其衍生载体	低拷贝	37540	0.5-1 μ g