

For research use only

Version Number: 2.0

General Plasmid Mini Kit

For plasmid DNA purification from gram-negative bacteria

试剂盒组成	DE-01001
	50 T
Buffer S1	12.5 mL
Buffer S2	12.5 mL
Buffer S3	17.5 mL
Buffer PW	25 mL
Buffer WB2	15 mL
Buffer EB	10 mL
DNA-Only Column	50 套
说明书	1 份

产品简介

本公司的 General Plasmid Mini Kit 采用 DNA-only 纯化柱技术及高效的 SDS 裂解方法，从细菌中获得高质量的质粒 DNA。基于公司特有的 DNA-Only 纯化柱和独特配方试剂，可以最大限度地去除 RNA，达到无需添加 RNA 酶，即可除去 RNA 的效果，使实验室免受 RNA 酶的污染。同时还可高效去除杂质蛋白、离子及细菌中的其他有机化合物。实际提取获得的质粒 DNA 产量及纯度与宿主菌的种类、培养条件、细菌裂解以及质粒拷贝数(高拷贝、低拷贝)等因素相关。

本试剂盒适用于革兰氏阴性菌的质粒 DNA 提取，获得的质粒 DNA 纯度高，无 RNA 酶、离子含量极低，能满足各种常规实验的要求，如：转化、酶切、PCR、文库构建、测序(建议使用 ddH₂O 洗脱质粒 DNA)。

储存条件

本试剂盒在常温(15–25°C)干燥条件下，可保存 24 个月；如需更长时间保存可置于 2–8°C。若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 菌液使用量不宜过多，建议菌液 OD₆₀₀=2.0-3.0，用量最多不超过 5 mL，否则会影响提取质粒 DNA 的产率及纯度。
- ❖ 使用前，仔细检查 Buffer S2 和 Buffer S3 中是否有沉淀析出，若有沉淀析出，请将其置于 37°C 溶解，混匀后再使用。
- ❖ 试剂盒使用前，请务必检查 Buffer WB2 是否按说明添加了无水乙醇。
- ❖ 洗脱体积：不应少于 50 μL，否则会影响质粒 DNA 产量。
- ❖ 所有实验步骤均在常温(15-25°C)进行，包括离心步骤均为使用台式离心机常温离心。
- ❖ 切记不要在任何 Buffer 中添加 RNA 酶。

操作步骤 (请严格按照本操作说明进行相关实验操作)

使用前请先在 Buffer WB2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取 1-5 mL 培养 16-20 hr 的菌液，加入离心管中，12,000 rpm(~13,400 ×g)离心 1 min，尽量吸净残留上清(菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

注意：建议菌液 OD₆₀₀=2.0-3.0，菌体不宜过量，否则会造成菌体裂解不完全，导致提取量和纯度偏低。建议使用 2 mL 离心管，在后续操作中比 1.5 mL 离心管将更容易使细菌沉淀与 Buffer S1 混匀。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μL Buffer S1，用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀，

彻底悬浮细菌沉淀，直到看不见细菌团块。

注意：如果有未完全混匀的菌块，会影响裂解，导致提取得率和纯度偏低。

- 向离心管中加入 **250 μ L Buffer S2**，轻柔地上下翻转 **6-8** 次使菌体充分裂解直到溶液呈均一胶冻状。

注意：轻柔稍慢地翻转，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 片断。此时菌液应变得黏稠，所用时间不应超过 5 min，以免质粒受到破坏。

- 向离心管中加入 **350 μ L Buffer S3**，立即上下颠倒 **6-8** 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。
12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **10 min**。

注意：Buffer S3 加入后应立即颠倒混匀，避免产生局部沉淀。将 Buffer S3 置冰上预冷，或加入 S3 混匀后静置 2 min，可提高产量。

- 将上清液小心转移到离心柱中(DNA-Only Column)，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **1 min**，弃掉收集管中的废液。

注意：尽量不要吸到沉淀，如果上清液中还有微小白色沉淀，可再次离心取上清，加入离心柱中。

- 向离心柱中加入 **500 μ L Buffer PW**，**3,000 rpm (~900 \times g) 低速离心 1 min**。弃掉收集管中的废液。

- 向离心柱中加入 **700 μ L Buffer WB2**(请再次检查 Buffer WB2 是否已添加了无水乙醇)，12,000rpm (~13,400 \times g) 离心 **1 min**，弃掉收集管中的废液。

- 重复步骤 7 一次。

- 将离心柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 \times g) 空管离心 **2 min**，去掉离心柱中残余的 Buffer WB2。

注意：Buffer WB2 中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。必要时可将离心柱开盖，置于室温放置数分钟，晾干残留洗涤液。

- 将离心柱放到一个干净离心管中，向硅胶膜中间位置滴加 **50-200 μ L** 已于 **65 $^{\circ}$ C** 预热的 **Buffer EB**(切勿将洗脱液添加到压圈上，否则会损失较大体积的洗脱液)，室温放置 **2 min**。12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 **1 min** 收集 DNA 溶液。

注意：为了提高 DNA 的回收量，可将离心得到的洗脱溶液重新加回离心柱中，重复步骤 10。洗脱体积不应小于 50 μ L，体积过少影响质粒 DNA 产量。

