

## Miniprep. plasmid purification

Jer-Ming Hu

modified from Dr. S.T.Liu's lab protocol

Spin down 1.5ml-3ml O/N culture cells at 12k rpm, 5min

↓ (you can spin twice)

Discard supernatant, resuspend pellet in **150μl Soln I**

↓ RT (or on ice) for 5min

Add **300μl Soln II** (fresh made), stay on ice no more than 5min

↓ inverted 10 times

Add **210μl Soln III**, stay on ice for 5min

↓ inverted 10 times

↓ centrifuge at 12k rpm, 5min, 4°C

Collect supernatant and add **500μl (or same volume) isopropanol**

↓ inverted 10 times

↓ centrifuge at 12k rpm, 5min, room temp.

Discard supernatant, wash DNA with **500μl 70% EtOH**

↓ inverted 30 times

↓ centrifuge at 12k rpm, 5min, 4°C

Drain EtOH and dry DNA pellet in SpeedVac 10min

Resuspend DNA pellet with **20μl RNase-containing (200μg/ml) TE** and **40μl H<sub>2</sub>O**

↓ incubated at 37°C for 1 hour

\*\*\*You can stop here and store the plasmids in -20°C, or do restriction enzyme digestion to determine the size (2-3ul of plasmids in 10ul rxn)\*\*\*

If you want some higher quality DNA, you can do the following:

Add **150μl H<sub>2</sub>O** and **200μl chloroform**

↓ inverted 30 times, centrifuge at 12k rpm, 5min, RT

Collect **200μl** upper aqueous phase and add **14μl 3M NaOAc**, then **500μl 100% EtOH**

↓ inverted 30 times, put in -20°C for ~30min

↓ centrifuge at 12k rpm, 15min, 4°C

Discard supernatant, wash DNA with **500μl 70% EtOH**

↓ inverted 30 times

↓ centrifuge at 12k rpm, 15min, 4°C

Drain EtOH and dry DNA pellet in SpeedVac 10min

Resuspend DNA pellet with **50μl TE**, and it is ready to store in -20°C

---

Soln I = 50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl, 4mg/ml lysozyme

Soln II = 0.2N NaOH, 1% SDS

Soln III = 3M potassium acetate, 5M acetic acid

## Notes on the reagents.

### **Solution I:**

50 mM glucose: 增加溶液中的黏稠度，因為高黏稠度可以減少 DNA 受到物理性損害的情況。

25 mM Tris pH8.0: 在這個 pH 下，可讓 DNase 無法作用。

10 mM EDTA: 二價陽離子的螯合劑(chelator)，可以抑制 DNase 和 RNase 的作用。

lysozyme: lyse 細胞。

### **Solution II:**

1% SDS: 其在高 pH 值下可使蛋白質變性，並可破壞細胞膜。

0.2N NaOH: 使溶液在 pH=12，dsDNA 變成 ssDNA，但因為 plasmid 是 supercoiled DNA，所以不會在後續的步驟沈澱下來。若沒加 NaOH，則 chromosome DNA 在下個步驟也不會沈澱下來，而和 plasmid DNA 一起留在溶液中，到時 DNA 就會不純。高 pH 還可把 RNA 的 phosphate bonds 打斷，可以避免它的干擾。

### **Solution III:**

Potassium acetate/acetic acid: 中和溶液 pH 值，potassium 會讓 SDS 及它所黏合的細胞膜(蛋白質)沈澱下來，而因為細菌的 chromosome DNA 會黏在細胞膜上，所以也會因此沈澱下來。

### **Isopropanol**

這裡可以用 100% EtOH 代替，但加的量是所 recovered 的 2.5 倍體積。原則上 isopropanol 的用量為體積的 0.6 倍，所以要注意所用 eppendorf 的大小，決定用那種沈澱方法。若是用 isopropanol，要注意其後的 EtOH wash 要徹底。

### **Chloroform**

這裡的 chloroform 有兩個用意，它可以去除先前 Soln I, II, III 不小心留下來的雜質，也可以將 RNase 去除。

### Other notes

\*加入 Solution II 之後，要避免劇烈搖動，以免 chromosome DNA 斷裂，影響之後萃取 plasmid DNA 的純度。