大型/大量质粒提取试剂盒

Maxi Plasmid Kit

产品信息：

试剂盒组成	保存	DP109-01 20 次
RNase A（干粉）	室温	1 支
溶液 P1	4℃	130ml
溶液 P2	室温	100ml
溶液 PIII	室温	100ml
杂质清除剂 A	室温	3ml
杂质清除剂 B	室温	30ml
内毒素清除剂	-20℃	10ml
DNA 溶解液	室温	10ml

保存条件：本产品收到后按照上面指示温度存放各成份，储存 18 个月不影响使用效果。

产品介绍：

本试剂盒用碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA，采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂，只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质，获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD260/280 通常在 1.8 左右，得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在 Eppendorf 管中操作，方法简单，不需特殊设备，无需过柱，不用酚氯仿抽提；基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒，不必担心质粒 DNA 的丢失。本方法提取纯化质粒 DNA，对质粒损伤小，即使是 10kb 甚至 100kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒，只要碱裂解法能够提取，就可以有效纯化。

产品特点：

1.不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速、 方便、从 100-200 ml 大肠杆菌 LB 培养液中，可快速提取 0.2-1mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90 %。

2.获得的质粒产量高，超螺旋比例高，纯度好，可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

3.内毒素含量极低（<0.1 EU/μg DNA），可直接应用于细胞转染。

注意事项：

1.**第一次使用时，将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100μg/ml）置于 4℃保存。**如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

2.内毒素清除剂在 4℃可保存一个月，如果要长期保存，建议保存在-20℃。

3.环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。

4.提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、PIII 的用量。

5.提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪大了开口的吸头，防止机械剪切对 DNA 的损坏。

6.DNA 沉淀液沉淀离心后，可能看不到明显沉淀。如未见沉淀，担心 DNA 丢失，可保留上清液，待完成全部操作后电泳鉴定，以确定是否获得终产物（数百微克 DNA 离心沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块）。

7.得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD260 值为 1 相当于大约 50μg/ml DNA。**电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带，**这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 95%。**

自备试剂：异丙醇、70%乙醇

操作步骤：

提示：将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，使用后置于 2-8℃保存。

1.取过夜培养菌 100-200ml 菌液，装入合适的离心瓶中，≥8000rpm 于 4℃离心 2 min 沉淀菌体，完全弃除上清。（如果离心机速度低于 8000rpm，可增加时间至 5min。）

2.加入 5ml 溶液 P1，充分混悬震荡菌体沉淀，使其完全分散开，至无絮块存在。

3.加入 5ml 溶液 P2，轻轻颠倒离心管 6~8 次使细菌完全裂解，溶液透明。

4.加 5ml 溶液 PIII，立即颠倒离心管 6~8 次，充分混匀，至白色絮状物产生。

5.上述裂解液于 4℃，≥8000rpm 离心 10 min，小心吸出上清，移入新的 50ml 离心管中。（如果离心机速度低于 8000rpm，可增加时间至 15-20min。）

6.加入 10ml 异丙醇，颠倒离心管，充分混匀(**可选：室温放置 10 min**)。

7.于 4℃，≥8000rpm 离心 10 min，小心弃去上清，倒置轻轻沥干残余液体，加入 3-5ml 70%乙醇漂洗一遍，最高速离心 2 min，弃上清，晾干沉淀。（可使用风扇吹干沉淀，

约需 2min。）

8.加入 1.4ml 溶液 P1 **完全溶解沉淀团块**（可用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解）。移入新的 1.5ml 离心管中，60℃水浴放置 10min。

9.最高速离心 2 min，取上清转入 2 个新的 1.5ml 离心管中（每个 700μl）。每管加入 55μl 杂质清除液 A，颠倒充分混匀。

10.加入约 **0.1 体积(约 80μl)冰预冷**的内毒素清除剂，颠倒旋转 7-10 次（30 秒左右）充分混匀，冰浴或者冰上放置≥10 min，中间偶尔颠倒混匀几次。**内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮。**

11.37℃水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后 37℃温育 5 min。

12.室温最高速离心 5min 分相（温度低时，内毒素清除剂无法分相，因此必须至少 20℃以上室温离心）。

13.溶液必须分为上下两相，否则应重复步骤 10-11。上层水相含 DNA，下层油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到油状层），弃油状层。

14.**可选步骤：根据对内毒素指标的要求重复抽提 1-2 次，即重复步骤 9-12 一两次，该步骤可以提高纯度，但是会损失一定量的质粒 DNA，请根据具体需要选择使用**。

15.将上一步所得上层水相中加入等体积杂质清除液 B（约 750μl），**轻柔混匀后冰上放置 10min，**4℃ 最高速离心 10 min，弃上清（注意不要丢失 DNA），轻轻加入 1ml 70%乙醇洗涤，离心弃上清，室温倒置晾干使乙醇完全挥发。（可使用风扇吹干沉淀，约需 2min。）

16.加适量 DNA 溶解液（200~500μl）溶解沉淀（可在 37℃水浴中振荡以辅助溶解）。要注意很多质粒 DNA 可能附着在离心管侧壁上，即使看不见，也应该充分吹打侧壁溶解回收质粒 DNA。

20261010