

# 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<br>20 次 |
|------------------|------|------------------|
| RNaseA (10mg/ml) | 室温   | 1.3ml            |
| 溶液 P1            | 室温   | 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 OD<sub>260/280</sub> 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 100-140 ml 大肠杆菌 LB 培养液中, 可快速提取 0.2-0.5mg 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, 纯度高, 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 100ug/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 50 $\mu$ g/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 <140ml 菌液, 装入合适的离心瓶中, 4,500~6,000xg 于 4℃ 离心 10 min 沉淀菌体, 完全弃除上清。
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。细菌悬液移入 50ml 离心管中, 室温放置 3~5 min。
3. 加入 5ml 溶液 P2, 轻轻颠倒离心管 6~8 次, 室温放置 5 min, 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。冰上放置 5-10min。
5. 上述裂解液于 4℃ 12,000~16,000xg 离心 15 min, 小心吸出上清, 移入新的 50ml 离心管中。

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℃ 12,000~16,000xg 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 5 min，弃上清，晾干沉淀。
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 10~20 min。
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. 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 16,000xg 离心 5-10 min 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 10~30 min**，4℃ 16,000xg 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 5~10 min 使乙醇完全挥发。
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。