



## 质粒大量提取纯化试剂盒

(Plasmid Maxprep Kit)

### 产品说明:

本试剂盒用碱裂解法从培养菌中提取质粒DNA，采用全新技术，通过几次离心去除蛋白质、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1.9左右，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；无论细菌裂解释放出的质粒在1mg以下还是在10mg以上，基本都可完全回收，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质粒，只要碱裂解法能够提取，就可以有效纯化。纯化过程约需1.5~2小时。

### 产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
Buffer I（重悬液）	110 ml	RT
Buffer II（裂解液）	100 ml	RT
Buffer III（中和液）	100 ml	RT
Buffer IV（杂质清除液A）	4 ml	4℃
Buffer V（杂质清除液B）	1.4 ml	RT
Buffer VI（杂质清除液C）	4 ml	4℃
RNase A（20 mg/ml）	0.5 ml	-20℃

试剂盒可作20次（<150ml菌液/次）质粒提取纯化。常温运输。RNase A于-20℃保存，首次使用时加入Buffer I中混匀，置4℃保存。Buffer IV与Buffer VI置4℃保存，其余溶液保存于室温。有效期6个月。

Buffer II和Buffer V可能会有沉淀产生。请各在37℃水浴和50℃水浴加热溶解，然后混匀使用。Buffer IV如有分层，混匀即可使用。

### 所需其它试剂:

使用者需准备TE（Tris-HCl 10 mM，EDTA 1 mM，pH 8.0，超纯水配制，高压或过滤灭菌），异丙醇和70%乙醇（超纯水与无水乙醇配制）。

### 操作方法:

#### 质粒提取:

- 1) 取过夜培养菌<150 ml菌液，装入合适的离心瓶中，4,500~6,000 x g于4℃离心10 min沉淀菌体，完全弃除上清。
- 2) 加入5 ml Buffer I，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50 ml离心管中。
- 3) 加入5 ml Buffer II，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) 加入5 ml Buffer III，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10~15 min。
- 5) 上述裂解液于4℃ 12,000~16,000 x g离心15 min，小心吸出上清，移入新的50 ml离心管中。
- 6) 加入10 ml 异丙醇，颠倒离心管，充分混匀。冰上放置10~15 min。
- 7) 于4℃ 12,000~16,000 x g离心10 min，小心弃去上清，倒置轻轻沥干残余液体，加入0.5 ml Buffer I，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1.5 ml离心管中，室温放置10~20 min。
- 8) 质粒粗提物用台式离心机室温高速离心2 min，上清移入新的1.5 ml离心管中。

#### 质粒纯化：

- 1) 0.5 ml质粒粗提液中加入100  $\mu$ l Buffer IV（杂质清除液A），轻轻混匀，12,000 x g离心2 min，将上清液转移至新的离心管中。
- 2) 再加入100  $\mu$ l Buffer IV（杂质清除液A），轻轻混匀，12,000 x g离心5 min，将上清液转移至新的离心管中。
- 3) 加入70  $\mu$ l Buffer V（杂质清除液B），轻轻混匀，12,000 x g离心5 min，将上清液转移至新的离心管中。
- 4) 加入0.5 ml异丙醇，混匀，室温放置10 min。12,000 x g室温离心10 min，弃去上清液，用70%乙醇1 ml轻轻洗涤，弃去液体，室温倒置凉干5 min。
- 5) 0.5 ml TE溶解沉淀（可在37℃水浴中振荡或用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解）
- 6) 加入200  $\mu$ l Buffer VI（杂质清除液C），混匀后冰上放置10~30 min，12,000 x g室温离心10 min，弃去上清液，轻轻加入1 ml 70%乙醇洗涤两次，室温倒置凉干5~10 min使乙醇完全蒸发。
- 7) 加适量TE（200~500  $\mu$ l）溶解沉淀（可在37℃水浴中振荡以辅助溶解）。

#### 注意事项：

- 1) 从大量的菌液或菌体提取质粒时，可按比例提高Buffer I、Buffer II和Buffer III的用量，以充分裂解菌体，提高质粒的回收量和纯度。
- 2) 提取步骤7和纯化步骤5中，充分溶解沉淀对提高质粒产量和纯度非常重要。
- 3) 操作中要动作轻柔，防止机械剪切可能对DNA的损失。
- 4) 可在纯化的各个步骤前后留取数微升的DNA溶液，最后电泳鉴定比较提取和纯化结果。
- 5) 纯化步骤3和6离心后，可能看不到明显沉淀。如在步骤6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（数百微克高纯度的质粒DNA离心后沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块）。
- 6) 应采用pH 8.0的TE或Tris为稀释溶液，测定OD及比值。纯水中测定的OD比值可能较低。