

**HighPure Plasmid Maxi Kit**  
**高纯度质粒大量提取试剂盒**

目录号: DNE71

**试剂盒组成**

试剂盒组成	保存	10 次
Buffer P1	室温	75 ml
Buffer P2	室温	75 ml
Buffer N3	室温	75 ml
Buffer WB1	室温	100 ml
Buffer WB2	室温	25 ml×2
		第一次使用前按说明加指定量无水乙醇
Buffer TE	室温	20 ml
RNase A (10 mg/ml)	4°C	750 µl
Onestep-Lysis <sup>®</sup> Columns BC	室温	10 个
Collection Tubes	室温	10 个
Manual		1 份

**保存方法**

RNase A 溶液常温运输,收到后 4°C 保存使用。本试剂盒室温保存 12 个月内效果稳定。

环境温度低时 Buffer P2 中 SDS 可能会析出浑浊或沉淀,使用前可 37°C 水浴加热几分钟恢复澄清,不要剧烈摇晃,以免形成过量泡沫。



扫一扫关注微信公众号

**本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。**

## 产品介绍

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂法裂解细胞，离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 PH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其他细菌成分去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

## 注意事项

- 1) 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按照比例增加 P1、P2、N3 的用量，其它步骤相同。
- 2) 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。**电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或多条 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有关。
- 3) **质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。**处于环状或超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。
- 4) 无需使用苯酚氯仿，也不需要乙醇沉淀。从 150-300 ml 大肠杆菌培养液中可快速提取 0.5-2 mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80% 左右。

## 标准抽提步骤

- 所有离心步骤均可在室温完成，使用转速可达 12,000×g，带 50 ml 转头的台式离心机即可。
  - 第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！
  - **第一次使用时，将试剂盒中所带的全部 RNase A 加入 Buffer P1 后混匀，置于 4℃ 保存。**
1. 取 150-200 ml (最多不超过 300 ml) 过夜培养的菌液，12,000×g (~10,000×rpm g) 离心 1 min，尽可能的弃掉上清，收集菌体。
    - 菌液超过 50 ml 时，可以离心弃上清后，在同一个 50 ml 离心管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
  2. 向菌体沉淀中加入 7.5 ml Buffer P1 (请先检查是否已加入 RNase A)，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。
    - 如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。[高纯度质粒大量提取试剂盒](#)
  3. 向离心管加入 7.5 ml Buffer P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4 min。
    - 温和地混合，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。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过 5 min，以免质粒受到破坏。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 向离心管中加入 7.5 ml Buffer N3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12,000×g 离心 10 min，小心取上清至新的离心管，避免吸到沉淀物。
    - Buffer N3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。
  5. 向上清中加入 0.5 倍体积异丙醇(~10 ml)后充分颠倒混匀，分多次(每次不超过 15 ml)转入 Onestep-Lysis® Columns BC 中(吸附柱 BC 放入收集管中)，12,000×g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，直至所有混合液通过吸附柱 BC。
  6. 可选步骤：向吸附柱 BC 中加入 10 ml Buffer WB1，12,000×g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。
    - 如果宿主菌是 end A-宿主菌 (DH5α, TOP10 等)，这步可省略。
    - 如果宿主菌是 end A+宿主菌 (TG1、BL21、HB101、JM 系列、ET12567 等)，这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒 DNA，推荐采用此步。
  7. 向吸附柱 BC 中加入 10 ml Buffer WB2 (请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000×g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 BC 放回收集管中。
  8. 重复操作步骤 7。
  9. 将吸附柱 BC 放回空收集管中，最高速(最好大于 12,000×g)离心 2 min，干燥硅胶膜上残留的乙醇。
    - 残留乙醇影响下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。
  10. 将吸附柱 BC 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 1-2 ml Buffer TE (TE 提前 65℃ 预热可增加产量)，室温放置 2 min，12,000×g 离心 1 min 收集质粒溶液。
    - 为了增加质粒的回收率，可将得到的 DNA 溶液重新加入吸附柱中，室温放置 1 min，12,000×g 离心 1 min，将质粒溶液收集到离心管中。洗脱两遍可提高浓度约 10%。
    - 如果需要较高质粒浓度，可以适当减少洗脱体积(不低于 1 ml)，但体积过小会降低质粒洗脱效率，减少质粒总产量。
-

---

---