



无内毒素大型大量质粒提取试剂盒（无柱型） （HighPure Plasmid Kit）

目录号：ZP106A

试剂盒内容：

试剂盒组成	保存	20 次
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	1.3ml
溶液 P1	4℃	130ml
溶液 P2	室温	100 ml
溶液 PIII	室温	110 ml
杂质清除剂 A	室温	3 ml
杂质清除剂 B	室温	30 ml
内毒素清除剂	-20℃	10 ml

储存条件：

第一次使用前将 RNase A 加入溶液 1 中，混匀后置于 2-8℃保存，可稳定保存一年以上。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℃！本试剂盒在室温（15-25℃）干燥条件下，可保存 1 年；更长时间的保存可置于 2-8℃。2-8℃保存条件下，若溶液产生沉淀，应在使用前置于 37℃下溶解沉淀。单独包装的 RNaseA 在-20℃可稳定保存 1 年以上。

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 100-140 ml 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)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. 内毒素含量可低至 1.5 EU/μg DNA，可直接应用于细胞转染。

❖ 注意事项

1. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、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。
2. 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。
3. 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）。
4. 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%。
5. 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。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道确切大小。

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°C 保存。

1. 取过夜培养菌 < 140 ml 菌液，装入合适的离心瓶中，4,500~6,000 x g 于 4°C 离心 10 min 沉淀菌体，完全弃除上清。

2. 加入 5 ml 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 50 ml 离心管中，室温放置 3~5 min。

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。

3. 加入 5 ml 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。

温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠，如果菌体少，很快清亮粘稠后就可以做下一步，不是一定要准确的 5 分钟。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. 加 5 ml 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 5-10 分钟。上述裂解液于 4°C 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。

加入溶液 PIII 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀，如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

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

6. 于 4°C 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 3-5ml 70%乙醇漂洗一遍，最高速离心 5 分钟，弃上清，晾干沉淀。

DNA 沉淀如果干燥过头，DNA 将无法完全溶解，但是如果乙醇没有晾干挥发干净，残留太多，也会造成 DNA 无法完全溶解。

7. 加入 1.4 ml 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 1.5 ml 离心管中，60°C 水浴放置 10~20 min。

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

9. 加入约 **0.1 体积(约 80μl)冰预冷的内毒素清除剂**到，颠倒旋转 7-10 次（30 秒左右）充分混匀，冰浴或者冰上放置 ≥ 10 分钟，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。

10. 42°C 水浴，溶液又会变为浑浊，颠倒混匀后 42°C 温育 5 分钟。

11. 室温 16,000 x g 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°C 以上室温离心）。

12. 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。

下相体积较小，室温较高（如夏季）时候可能表现为混浊，和透明的上相分层明显，如果室温较低（如冬季），下相可能表现为透明的油状物质，和透明上相分层仅仅表现为界面的折光性不一致，应该仔细观察。

13. **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。**

14. 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°C 16,000 x g 离心 10 min，弃上清（注意不要丢失 DNA），轻轻加入 1 ml 70%乙醇洗涤，离心弃上清，共两次，室温倒置晾干 5~10 min 使乙醇完全挥发。

15. 加适量 TE（200~500μl）溶解沉淀（可在 37°C 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。