



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
订货热线: 400-1683301 或 800-8283301  
订货 e-mail: order@beyotime.com  
技术咨询: info@beyotime.com  
网址: http://www.beyotime.com

## 质粒大量抽提试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0026	质粒大量抽提试剂盒	20次

### 产品简介:

- 碧云天的质粒大量抽提试剂盒(Plasmid Maxi Preparation Kit, Plasmid Maxiprep Kit)是一种用于从大肠杆菌中进行大量质粒快速抽提的离心柱式试剂盒。
- 本试剂盒适用于常用的  $EndA^-$  菌株 DH5A、JM109 和 XL-1 blue 等。对于  $EndA^+$  菌株如 JM110、BL21 (DE3)、TG1 和 HB101 等, 可以顺利完成质粒抽提, 但从  $EndA^+$  菌株中抽提获得的质粒会有轻微的核酸酶污染, 如果在内切酶缓冲液中  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 小时会导致质粒全部降解。从  $EndA^+$  菌株中抽提质粒时推荐使用碧云天的 D0007S/D0007M 质粒小量抽提试剂盒(通用型)、D0020 质粒中量抽提试剂盒(通用型)和 D0028 质粒大量抽提试剂盒(通用型)。
- 野生型大肠杆菌中表达 Endonuclease I, 能切割并降解双链 DNA。编码 Endonuclease I 的基因是 *endA*, 如果 *endA* 突变失活, 其基因型会被标注为 *endA1*, 相应的突变菌株被称为  $EndA^-$  菌株, 而野生型菌株则被称为  $EndA^+$  菌株。常见的  $EndA^-$  和  $EndA^+$  菌株参见附表 1。从  $EndA^+$  菌株中抽提的质粒, 微量核酸酶和质粒结合而容易被共纯化, 导致容易降解。
- 本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱。在特定条件下, 使质粒能在离心过柱的瞬间, 结合到质粒纯化柱上, 在一定条件下又能将质粒充分洗脱, 从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提, 无需酒精沉淀, 6 个样品只需不足 90 分钟即可完成。
- 每个质粒纯化柱可以结合的质粒量的上限大于 500 微克。每个纯化柱可用于抽提 100 毫升左右用 LB 培养过夜的大肠杆菌。抽提所得质粒的 OD260 和 OD280 比值一般在 1.80 左右。抽提获得的质粒量会受质粒拷贝数等因素影响。抽提获得的质粒 DNA 的 OD260 和 OD280 比值也会因菌种不同等原因而略有波动。
- 本试剂盒抽提得到的质粒可直接用于转染细胞, DNA 测序, PCR, 基于 PCR 的突变, 体外转录, 转化细菌, 内切酶消化等。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0026-1	溶液 I (悬浮液)	105ml
D0026-2	溶液 II (裂解液)	105ml
D0026-3	溶液 III (结合液)	150ml
D0026-4	溶液 IV (洗涤液)	100ml (第一次使用前加入 150ml 无水乙醇)
D0026-5	溶液 V (洗脱液)	60ml
D0026-6	RNase A (100mg/ml)	105 $\mu$ l
D0026-7	大抽质粒纯化柱及废液收集管	20套
—	说明书	1份

### 保存条件:

室温保存, 一年有效。

### 注意事项:

- 第一次使用前把试剂盒提供的 RNase A 全部加到溶液 I (悬浮液) 中, 混匀, 并在瓶上做好标记。加入 RNase A 后  $4^\circ\text{C}$  存放。
- 第一次使用前在溶液 IV (洗涤液) 中加入 150ml 无水乙醇, 混匀, 并在瓶上做好标记。
- 温度较低时, 溶液 II 和溶液 III 可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀,  $37^\circ\text{C}$  水浴加热溶解, 混匀后使用。溶液 II 请勿过分剧烈混匀, 否则会产生大量气泡。
- 溶液 II 使用完后, 一定要盖紧瓶盖, 防止被空气中二氧化碳酸化。
- 溶液 II 有强碱性, 溶液 II 和溶液 III 对人体有刺激性, 操作时请小心, 并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
- 废液收集管在一次抽提中需多次使用, 切勿中途丢弃。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

1. 取过夜菌至 50 毫升离心管内,  $5000\text{g}$  离心 1 分钟收集细菌沉淀, 弃上清。再重复一次, 每管共收集 100 毫升过夜菌沉淀。通常大肠杆菌宜用 LB 培养过夜 (16 小时左右) 至 OD 值为 2-4。建议  $5000\text{g}$  (通常为  $5000\text{rpm}$  左右) 室温离心 1 分钟, 如沉淀不充分

则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密，不利于加入溶液I后散开沉淀。直接倒掉上清，再倒入约50毫升菌液并重复上述操作，然后倒置于吸水纸上(可用普通草纸)，使液体流尽。如果细菌密度明显偏低，可考虑使用更多菌液，再重复上述操作1-2次。对于高拷贝质粒所用菌量每管一般不能超过150毫升，对于低拷贝质粒所用菌量每管一般不能超过200毫升。过量的细菌会导致后续的裂解不充分。

**2. 每管加入5毫升溶液I，重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开，无可见细菌团块。**

确认溶液I中已添加了RNase A。最高速度vortex 10-20秒或更长时间，悬起沉淀。一定要充分混匀，对着光亮处观察应呈均匀的悬浊液，无明显细菌团块或絮块。如果没有vortex，可以用枪吹打沉淀使沉淀逐渐散开，或手指把沉淀弹开。

**3. 每管加入5毫升溶液II，轻轻颠倒离心管4-6次，室温放置1-2分钟，使细菌完全裂解，溶液透明。**

切勿vortex！vortex或其它剧烈操作会导致基因组DNA断裂，易导致最终所得质粒被基因组DNA污染。颠倒4-6次后，溶液应变得透明，无团块或絮状物。如果加入溶液I后细菌没有完全散开，那么颠倒4-6次后，可能还会有团块或絮状物。遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数3-5次，再室温放置2-3分钟，但总裂解时间不可超过5分钟。

**4. 每管加入7毫升溶液III，随即颠倒离心管4-6次混匀，可见白色絮状物产生。**

切勿vortex！颠倒次数也不宜过多，否则易导致最终所得质粒的质量下降。

**5. 12,000-14,000rpm室温离心10分钟。**

如果离心机的最高速度较低，需要适当延长离心时间，例如约5000-6000rpm时需要离心20-30分钟或更长时间，直至沉淀充分。离心时可以准备好质粒纯化柱，自制漏斗等，并在纯化柱上标上记号。

**6. 将上一步骤离心后的上清倒入或吸入到质粒纯化柱内。12,000-14,000rpm离心2分钟，倒弃收集管内液体。**

质粒倒入质粒纯化柱后，可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。本步骤及后续需要12,000-14,000rpm离心2分钟的步骤，如果离心机的最高速度较低，需要适当延长离心时间，例如约5000-6000rpm时需要离心约5分钟或更长时间，直至液体全部穿柱。如果离心后有少量漂浮物，可以考虑再次离心，或者使用擦镜纸两次对折后打开形成的自制漏斗，以过滤去除漂浮物。

**7. 在质粒纯化柱内加入12毫升溶液IV，12,000-14,000rpm离心2分钟，洗去杂质，倒弃收集管内液体。**

加入溶液IV后可以不用等待，直接离心。倒弃收集管内的液体后，保留收集管继续使用。

**8. 12,000-14,000rpm再次离心2分钟，除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。**

**注意：**倒弃收集管内液体后再离心，才能彻底去除微量的溶液IV。微量的溶液IV会影响质粒的质量。

**9. 将质粒纯化柱置于50毫升离心管上，加入2毫升溶液V至管内柱面上，放置2分钟。**

也可以用重蒸水或Milli-Q级纯水替代溶液V，但是水的pH应不小于6.5。溶液V加入后放置时间稍长，对于增加质粒产量会略有帮助。如想得到较高浓度的质粒，可以加入1毫升溶液V洗脱，质粒得率实测减少约5-10%，具体减少量与特定样品有关。

**10. 12,000-14,000rpm离心2分钟，所得液体即为转细胞级超纯质粒。**

通常所得质粒浓度为0.1-0.3mg/ml左右，可以用于细胞转染。如果想得到高浓度的质粒，可以采用如下的异丙醇沉淀方法浓缩质粒或常规的乙醇沉淀方法。

**a. 加入0.7倍体积的常温异丙醇(例如1毫升待浓缩质粒中加入0.7毫升异丙醇)，混匀后1,2000-14,000rpm 4°C离心10分钟，小心吸去上清液，避免触及沉淀。**

如果希望获得较高浓度的质粒，在洗脱时推荐采用1毫升洗脱液进行洗脱，后续可以转移到2毫升离心管内进行异丙醇沉淀，这样操作起来相对比较方便。异丙醇沉淀的DNA为玻璃状近透明的颗粒状沉淀，和乙醇沉淀产生的含盐沉淀物相比较难观察清楚。离心后取放离心管要尽量轻柔，避免沉淀松动或部分颗粒状悬浮至溶液中。不推荐直接倒弃上清，直接倒弃上清时经常出现直接把质粒沉淀倒掉的情况；如果偏好直接倒弃上清，建议把上清倒弃至一洁净离心管内，这样万一沉淀被倒出，仍然可以从洁净离心管中回收。推荐用移液枪吸去上清，并注意尽量避免吸走沉淀。

**b. 加入1毫升常温70%乙醇溶液，轻轻悬起质粒沉淀以充分洗涤，12,000-14,000rpm 4°C离心5-10分钟，小心吸去上清液，避免触及沉淀。**

**c. 5,000-10,000rpm 4°C离心5-10秒，用20微升或200微升移液器小心吸净残留液体，避免触及沉淀。**

**d. 肉眼观察无明显液体后(吸净液体后通常在1分钟内即可完成干燥)，加入适当体积的溶液(如溶液V、10mM Tris-Cl pH8.5或Milli-Q级纯水)溶解DNA。**

DNA样品不能过于干燥，否则很难溶解。最好在弱碱性条件下溶解DNA，溶解时可用缓冲液反复冲洗管壁，使管壁上的DNA充分溶解。

**附表1. EndA<sup>-</sup> and EndA<sup>+</sup> strains of *E. coli*.**

EndA <sup>-</sup>	EndA <sup>+</sup>
BJ5183	BL21 (DE3)
DH1	CJ236
DH20	HB101
DH21	JM83
DH5α	JM101
JM103	JM110
JM105	LE392
JM106	MC1061

JM107	NM522 (all NM series are EndA <sup>+</sup> )
JM108	NM554
JM109	P2392
MM294	PR700 (all PR series are EndA <sup>+</sup> )
SK1590	Q358
SK1592	RR1
SK2267	TB1
SRB	TG1
TOP10	Y1088 (all Y10 series are EndA <sup>+</sup> )
XL1-Blue	BMH 71-18
XLO	ES1301

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0003	质粒小量抽提试剂盒	200次
D0005	质粒小量抽提试剂盒	50次
D0007S	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	50次
D0007M	质粒小量抽提试剂盒(通用型)	200次
D0018	质粒中量抽提试剂盒	50次
D0020	质粒中量抽提试剂盒(通用型)	50次
D0026	质粒大量抽提试剂盒	20次
D0028	质粒大量抽提试剂盒(通用型)	20次

#### 使用本产品的文献:

1. Jing RR, Cui M, Sun BL, Yu J, Wang HM. Tissue-specific expression profiling of receptor for advanced glycation end products and its soluble forms in esophageal and lung cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Jun;14(3):355-61.
2. Yongjin J. Zhou, Fan Yang, Sufang Zhang, Haidong Tan and Zongbao K. Zhao. Efficient gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* using marker cassettes with long homologous arms prepared by the restriction-free cloning strategy. *World J Microb Biot*. 2011 Dec;27(12):2999-3000.
3. Zhou Y, Wang L, Yang F, Lin X, Zhang S, Zhao ZK. Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD(+)-auxotrophic mutant. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Sep;77(17):6133-40.
4. Lu C, Tong F, Tang X, Zeng X, Liu D. Poly(L-lysine)-based cylindrical copolypeptide brushes as potential drug and gene carriers. *J Control Release*. 2015 Sep 10;213:e24-5.
5. He WH, Jin MM, Liu AP, Zhou Y, Hu XL, Zhu YM, Liu AX. Estradiol promotes trophoblast viability and invasion by activating SGK1. *Biomed Pharmacother*. 2019 Sep;117:109092.

Version 2021.09.01