



# Plasmid Purification GigaPrep Kit

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用流程.....	1
3. 订购信息及相关产品.....	3

## 1. 产品介绍

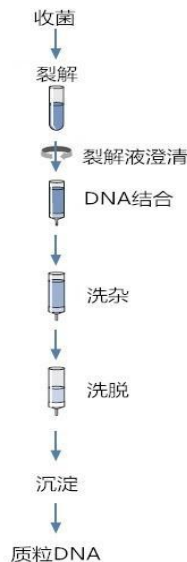
**Plasmid Purification MaxiPrep Kit** (质粒 DNA 大量抽提试剂盒) 是一种用于从大肠杆菌中进行大量质粒的快速抽提的试剂盒。本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱，在特定条件下，使质粒 DNA 样品在重力下流过柱子时，结合到纯化柱上，在一定条件下又能将质粒 DNA 充分洗脱，从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提。三步过柱（上样、洗杂和洗脱）纯化，使质粒 DNA 纯度提高，达到转细胞级要求，每个质粒纯化柱的质粒 DNA 最大结合能力分别达到 10 mg、30 mg 和 100 mg。

表 1. Plasmid Purification GigaPrep Kit 组成

试剂名称	100 mg
Buffer P1	1.2 L
Buffer P2	1.2 L
Buffer P3	1.2 L
RNase	120 mg
Wash Buffer	1.5 L×3
ER Buffer (可选)	360 ml
Elution Buffer	1.2 L
TE Buffer	100 ml
Plasmid Purification Beads	300 ml

## 2. 使用流程

### Plasmid Purification GigaPrep Kit 使用流程示意图



### 2.1 菌体制备

**2.1.1** 从-80℃冰箱中取出菌种或者挑单克隆菌斑，接种于 4 ml 初始 LB 培养基试管中，37 度振荡培养 8 小时，转速为 200 rpm。然后将初始培养菌液按 1/1000 接种到发酵 LB 培养基中。对于高拷贝的质粒，用 10 ml 的初始培养基接种 10 L 含有合适抗生素的发酵 LB 培养基。对于低拷贝的质粒，用 20 ml 的初始培养基接种 20 L 含有合适抗生素的 LB 发酵培养基。37℃ 振荡过夜培养(15 小时左右)，转速为 200 rpm。  
 注：如果质粒表达量偏低，可以换用 TB 培养基，或增加 LB 培养基体积，1000 ml P1 Buffer 最多能重悬 20 L LB 培养基表达菌体。

**2.1.2** 过夜培养的菌液，5000 rpm(3800×g)，离心 5 min，弃去培养基，保留沉淀。



## 2.2 质粒抽提

### 2.2.1 菌体裂解

将 1000 ml P1 Buffer 加入菌体沉淀中，将菌体充分悬浮。

**注意：使用前请添加 RNase A 到 P1 Buffer，终浓度为 100 µg/ml。**

加 1000 ml P2 Buffer 到已悬浮好的菌液中，缓慢混合均匀（不能剧烈震荡），进行裂解，操作时间不能超过 5 min（防止基因组污染）。

再向裂解体系中加入 1000 ml P3 Buffer，缓慢混合均匀（不能剧烈震荡），出现片状沉淀。7,000 rpm(7,500×g)，离心 10 min，再使用滤纸过滤所得上清。

### 2.2.2 填料准备（大约需要 10 min,可在样品离心时准备）

在收集菌体离心的过程中，准备 MaxiPrep column，将 MaxiPrep Column 置于铁架台上，自然流干其中的保护液，再用 900 ml ddH<sub>2</sub>O 清洗填料，再 900 ml Wash Buffer 平衡填料，靠重力流干 Wash Buffer。

### 2.2.3 上样

如果需要去除内毒素，请将 ER Buffer 按照步骤 1 中过滤的上清液体积的十分之一加入上清液中，一般为 300 ml，4℃ 孵育 30 min。

如果不需要去除内毒素，请直接将步骤 1) 中过滤的上清液倒入平衡好的柱子内，重力流完样品。

### 2.2.4 洗杂

待上样结束后，使用 3.6 L Wash Buffer 进行洗杂，根据柱管容量可以分几次加入，重力流完 Wash Buffer。

### 2.2.5 洗脱

待洗杂结束后，向柱管中加入 1.2 L Elution Buffer，并使用 50 ml 离心管收集流出液。

### 2.2.6 异丙醇沉淀

向含有 1.2 L 洗脱液的离心管中加入 840 ml 异丙醇，缓慢混匀，离心机 10000 rpm(15000×g)，15 min，4℃，离心沉淀质粒。缓慢倒掉上清（尽量保证沉淀不被悬起）。

**注：推荐加入异丙醇后，放置于-20℃，30 min，更有利于沉淀形成，提高回收率。**

### 2.2.7 乙醇清洗

向沉淀中加入适量 70%乙醇，离心机 7000 rpm(7500×g)，10 min，4℃，缓慢倒掉上清，室温下，静置，待乙醇挥发完全。

### 2.2.8 质粒溶解

使用 100 ml ddH<sub>2</sub>O（或者 TE）溶解沉淀，即得到质粒溶液。使用分光光度计测 A260，定量，A260/A280 的比值应该在 1.8~2.0 之间。使用琼脂糖电泳检测质粒纯度。

## 3. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Plasmid Purification MidiPrep Kit	SI020K05	5 Assays
	SI020K10	10 Assays
Plasmid Purification MaxiPrep Kit	SI014K05	5 Assays
	SI014K10	10 Assays
MaxiPrep Buffer Kit	SI014KB	10 Assays
Plasmid Purification GigaPrep Kit	SI017030	10 mg (30 ml)
	SI0170100	30 mg (100 ml)
	SI0170300	100 ml (300 ml)
	SI0170300*3	100 mg*3(300 ml*3)
GigaPrep Buffer Kit	SI017B05	5 Assays
Plasmid Purification Beads	SI014030	30 ml
	SI014100	100 ml
	SI014300	300 ml
	SI014500	500 ml
	SI01401L	1 L