



Rapid Plasmid Purification MegaPrep 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.....	2

1. 产品介绍

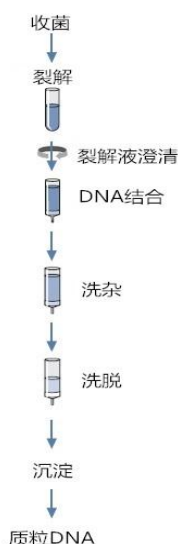
Rapid Plasmid Purification MegaPrep Kit (质粒 DNA 大量抽提试剂盒) 是一种用于从大肠杆菌中进行大量质粒的快速抽提的试剂盒。本试剂盒采用了聚合物离子交换柱, 在特定条件下, 使质粒 DNA 样品在重力下流过柱子时, 结合到纯化柱上, 在一定条件下又能将质粒 DNA 充分洗脱, 从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提。三步过柱 (上样、洗杂和洗脱) 纯化, 使质粒 DNA 纯度提高, 达到转细胞级要求, 每个质粒纯化柱的质粒 DNA 结合能力达到 2mg 以上。

表 1. Rapid Plasmid Purification MegaPrep Kit 组成

试剂名称	5次	10次
Buffer P1	100 ml	200 ml
Buffer P2	100 ml	200 ml
Buffer P3	100 ml	200 ml
RNase A	10 mg	20 mg
Wash Buffer	250 ml	500 ml
ER Buffer (可选)	30 ml	60 ml
Elution Buffer	50 ml	100 ml
TE Buffer	20 ml	40 ml
Rapid Plasmid Purification Column	5 根	10 根

2. 使用流程

Rapid Plasmid Purification MegaPrep 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℃振荡培养 8 小时, 转速为 200 rpm。8 h 后将 4 ml 培养菌液转入 400 ml 丰富培养基, 37℃振荡过夜培养 (15 h 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, 10 ml P1 Buffer 最多能重悬 200 ml LB 培养基表达菌体。

2.1.2 过夜培养的菌液, 6000 rpm, 离心 10 min, 弃去培养基, 保留沉淀。





2.2 质粒抽提

2.2.1 菌体裂解

2g 菌泥用 20 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 ug/ml。

加 20 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 20 ml P3 Buffer, 缓慢混合均匀 (**不能剧烈震荡**), 出现片状沉淀。7000 rpm, 离心 20 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 Rapid Plasmid Purification Column, 将 Rapid Plasmid Purification Column 置于铁架台上, 先用 8 ml ddH₂O 清洗填料 (备注: 可在 ddH₂O 流干前, 封闭下堵头, 把柱管竖直放在桌子上轻敲几下排出柱体内的气泡), 再加入 10 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 6 ml, 4℃ 孵育 30 min。

如果不需要去除内毒素, 请直接将步骤 2.2.1 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 40 ml 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 10-16 ml Elution Buffer, 并使用 50 ml 离心管收集流出液。

2.2.6 异丙醇沉淀

向含有洗脱液的离心管中加入 0.7 倍 (V/V) 洗脱体积的异丙醇, 缓慢混匀, 离心机 11000 rpm, 20 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

向沉淀中加入一倍洗脱液体积的 70% 乙醇, 离心机 11000 rpm, 25 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

取适量 ddH₂O (或者 TE Buffer) 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
Rapid Plasmid Purification MegaPrep Kit	SI125K05	5 Assays
	SI125K10	10 Assays
Phmac PlasmidPure Beads	SA154005	5 ml
	SA154025	25 ml
	SA154100	100 ml
	SA154500	500 ml
	SA15401L	1 L
	SA15410L	10 L

