



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

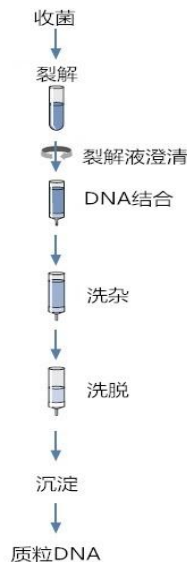
Plasmid Purification GigaPrep Kit (质粒 DNA 大量抽提试剂盒) 是一种用于从大肠杆菌中进行大量质粒的快速抽提的试剂盒。本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱, 在特定条件下, 使质粒 DNA 样品在重力下流过柱子时, 结合到纯化柱上, 在一定条件下又能将质粒 DNA 充分洗脱, 从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提。三步过柱 (上样、洗杂和洗脱) 纯化, 使质粒 DNA 纯度提高, 达到转细胞级要求, 每个质粒纯化柱的质粒 DNA 最大结合能力分别达到 10 mg、30 mg 和 100 mg。

表 1. Plasmid Purification GigaPrep Kit 组成

试剂名称	10 mg
Buffer P1	120 ml
Buffer P2	120 ml
Buffer P3	120 ml
RNase	12 mg
Wash Buffer	450 ml
ER Buffer (可选)	36 ml
Elution Buffer	120 ml
TE Buffer	10 ml
Plasmid Purification Beads	30 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 1000 μl 的初始培养基接种 1 L 含有合适抗生素的发酵 LB 培养基。对于低拷贝的质粒, 用 2000 μl 的初始培养基接种 2 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, 120 ml P1 Buffer 最多能重悬 2 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 120 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 120 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 120 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，准备纯化重力柱，将 Plasmid Purification Beads 装入重力柱中，重力柱固定在铁架台上，自然流干其中的保护液，再用 90 ml ddH₂O 清洗填料，再 90 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 36 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 360 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 120 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 120 ml 洗脱液的离心管中加入 84 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 10 ml ddH₂O（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