



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

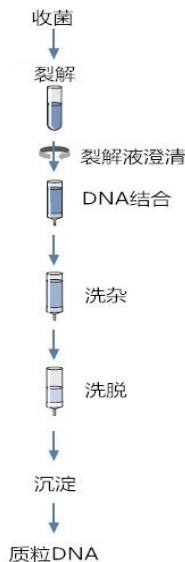
Plasmid Purification GigaPrep Kit (质粒 DNA 大量抽提试剂盒) 是一种用于从大肠杆菌中进行大量质粒的快速抽提的试剂盒。本试剂盒采用了一种新型的离子交换柱, 在特定条件下, 使质粒 DNA 样品在重力下流过柱子时, 结合到纯化柱上, 在一定条件下又能将质粒 DNA 充分洗脱, 从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提。三步过柱 (上样、洗杂和洗脱) 纯化, 使质粒 DNA 纯度提高, 达到转细胞级要求, 每个质粒纯化柱的质粒 DNA 最大结合能力分别达到 10 mg、30 mg 和 100 mg。

表 1. Plasmid Purification GigaPrep Kit 组成

试剂名称	30 mg
Buffer P1	400 ml
Buffer P2	400 ml
Buffer P3	400 ml
RNase	40 mg
Wash Buffer	1.5 L
ER Buffer (可选)	120 ml
Elution Buffer	400 ml
TE Buffer	30 ml
Plasmid Purification Beads	100 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 3 ml 的初始培养基接种 3 L 含有合适抗生素的发酵 LB 培养基。对于低拷贝的质粒, 用 6 ml 的初始培养基接种 6 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, 300 ml P1 Buffer 最多能重悬 6 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 300 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 300 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 300 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 90 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 1.2 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 400 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 400 ml 洗脱液的离心管中加入 280 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 30 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