



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 大型/大量质粒提取试剂盒
 - ◆ 目录号 1214
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

大型/大量质粒提取试剂盒

LarSca EndoFree Maxi Kit

目录号: 1214

目录编号	包装单位
121401	20次

❖ **适用范围:**

适用于大量高纯或者转染级质粒制备和 BAC/PAC 大型质粒制备

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	20 次 (121401)
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	1.3ml
溶液 P1	4℃	130ml
溶液 P2	室温	100 ml
溶液 PIII	室温	110 ml
杂质清除剂 A	室温	3 ml
杂质清除剂 B	室温	30 ml
内毒素清除剂	-20℃	10 ml

本试剂盒在室温储存 18 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. **第一次使用时,将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后(终浓度 100 μ g/ml)置于 4 $^{\circ}$ C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活,提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留,在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。**
2. 内毒素清除剂在 4 $^{\circ}$ C 可保存一个月,如果要长期保存,建议保存在-20 $^{\circ}$ C!
3. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀,可在 37 $^{\circ}$ C 水浴加热几分钟,即可恢复澄清,不要剧烈摇晃,以免形成过量的泡沫。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化,各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍:**

本试剂盒用碱裂解法从培养菌中提取质粒 DNA,采用独特的溶液配方和内毒素清除试剂,只需要几次简单离心去除蛋白质、多糖、内毒素、RNA 等杂质,获得高质量的质粒 DNA。纯化 DNA 的 OD_{260/280} 通常在 1.8 左右,得到的质粒可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的工作中。纯化后期过程均在 1.5ml 小离心管中操作,方法简单,不需特殊设备,无需过柱,不用酚氯仿抽提;基本可完全回收细菌裂解释放出的质粒,不必担心质粒 DNA 的丢失。本方法提取纯化质粒 DNA,对质粒损伤小,即使是 10kb 甚至 100kb 以上的大型质粒或超大型 BAC/PAC 质粒,只要碱裂解法能够提取,就可以有效纯化。可选择任意小体积溶解质粒,浓度可高达 5 μ g/ μ l。超螺旋比例可高达 95%,无内毒素,转染效果好。

❖ **产品特点:**

1. 不需要使用有毒的苯酚,氯仿等试剂,也不需要乙醇沉淀。快速、方便、从 150-200 ml 大肠杆菌 LB(Luria-Bertani)培养液中,可快速提取 0.5-2mg 纯净的高拷贝质粒 DNA,提取率达 80-90%。
2. 获得的质粒产量高,超螺旋比例可高达 95%,浓度可达 5 μ g/ μ l,纯度好,可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

-
3. 内毒素含量极低 (<10 EU/ μ g DNA)，可直接应用于细胞转染。

❖ **注意事项**

1. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、P111 的用量。
2. 提取大质粒时操作动作要轻柔，应该使用剪大了开口的吸头，防止机械剪切对 DNA 的损坏。
3. **DNA 沉淀液沉淀离心后，可能看不到明显沉淀。如未见沉淀，担心 DNA 丢失，可保留上清液，待完成全部操作后电泳鉴定，以确定是否获得终产物（数百微克 DNA 离心沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块）。**
4. 得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD260 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml DNA。**电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带**，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 95%。**
5. **质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后**，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道确切大小。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

⇒ **提示：**将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，使用后置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

1. 取过夜培养菌 150 ml 左右菌液（最大不超过 180ml-200ml），装入合适的离心瓶中，10,000 x g 于 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min 沉淀菌体，完全弃除上清。
2. 加入 5 ml 溶液 P1，充分混悬震荡菌体沉淀，使其完全分散开，至无絮块存在。细菌悬液移入 50 ml 离心管中，室温放置 3~5 min。

如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

-
3. 加入 5 ml 溶液 P2, 轻轻颠倒离心管 6~8 次, 室温放置 4-5 min, 使细菌完全裂解, 溶液透明。

温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免基因组 DNA 剪切断裂! 使用时不应超过 5 分钟! 以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠, 如果菌体少, 很快清亮粘稠后就可以做下一步, 不是一定要准确的 5 分钟。如果未变得清亮, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。

4. 加 5 ml 溶液 PIII, 立即颠倒离心管 6~8 次, 充分混匀, 至白色絮状物产生。上述裂解液于 4°C 12,000~16,000 x g 离心 10~15 min, 小心吸出上清, 移入新的 50 ml 离心管中。

加入溶液 PIII后应该立即混匀, 以免产生 SDS 的局部沉淀。

5. 加入 10 ml 异丙醇, 颠倒离心管, 充分混匀。
6. 于 4°C 12,000~16,000 x g 离心 10 min, 小心弃去上清, 倒置于吸水纸上轻轻沥干残余液体, 加入 1.4 ml 溶液 P1 **完全溶解沉淀团块, 注意附着在侧壁上的质粒沉淀虽然看不见, 也要吹打侧壁涮洗下来** (大质粒可用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解)。然后将质粒溶液转入 2 个新的 1.5 ml 离心管中 (每个 700 μ l)。

注意: 离心沉淀后, 质粒纯度很高吸附在管底和侧壁可能看不见沉淀, 但是不影响产量, 仔细吹打管底和沉淀所在的侧壁涮洗溶解质粒。

可选步骤 (一般不需要): 如果菌株 RNA 丰富有微量 RNA 残留, 可在此步骤后将质粒溶液 60°C 孵育 15 min 消化 RNA。