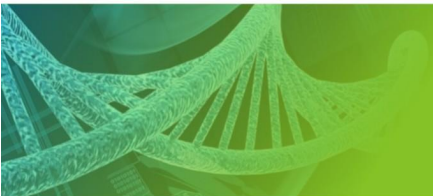


**Imagene**®

**Plasmid Maxi Kit**  
**质粒大量快速提取试剂盒**



**CODONX**  
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

## 质粒大量快速提取试剂盒

目录号 PE109

### 使用说明书

网站: [www.codonx.com](http://www.codonx.com)

咨询电话: 010-56315162

技术支持 QQ: 3090544158

1/试剂盒组成、储存、稳定性

2/储存事项

3/产品介绍

4/产品特点

5/注意事项

6/操作步骤

## 1/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10 次(PE109-01)
RNaseA (10mg/ml)	- 20°C	750µl
溶液 A	4°C	77 ml
溶液 B	室温	77 ml
溶液 D	室温	77 ml
去蛋白液 PE	室温	63ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	25 ml × 2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
吸附柱 DC 和收集管 CT (50ml)	室温	10 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

## 2/储存事项:

- 第一次使用时, 将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 A 后 (终浓度 100µg/ml) 置于 4°C 保存。如果溶液 A 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在溶液 A 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 B 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀, 可在 37°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。
- 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。

## 3/产品介绍:

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞, 离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA, 再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除, 最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

#### 4/产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 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150-300ml 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 %以上。
3. 获得的质粒产量高、超螺旋比例高、纯度好，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

#### 5/注意事项:

1. 本试剂盒适用菌株为XL-1 Blue、ToA0和DH5 $\alpha$ 等核酸酶含量低缺陷型菌株。**所用菌株为JM系列、HB101等endA菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应购买本公司生产的高纯度质粒大量快速提取试剂盒(PE110)。**
2. **所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成**，使用转速可以达到12,000 x g，带50ml转头的台式离心机。
3. 提取质粒的量与细菌培养浓度、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A、B、D的用量，洗脱缓冲液应在70°C预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，提高提取效率。
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 $\mu$ 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90%。**
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，无法通过电泳知道其确切大小。
6. **洗脱液EB不含有螯合剂EDTA**，不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗**

脱，但应该确保pH大于7.5，pH过低影响洗脱效率。用水洗脱，质粒应该保存-20°C。质粒DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

## 6/操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

### 提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 A 中，混匀。每次使用后置于 2-8°C 保存。

1. 取 150-200 ml (最多不超过 300 ml) 过夜培养的菌液，12,000 x g (约 10,000rpm)，离心 1-2 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。  
**收集超过 50 毫升菌液，可以离心弃上清后，在同一个 50ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。**
2. 用 7.5ml 溶液 A 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。  
**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 7.5ml 的溶液 B，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 分钟。  
**温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。**
4. 加 7.5ml 溶液 D，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。12,000 x g 离心 10-15 分钟，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮的白色沉淀。  
**加入溶液 D 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。**
5. 向上清中加入 0.5 体积异丙醇（约 10ml）后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过 15ml）转入吸附柱 DC 中（吸附柱放入收集管中），12,000 x g 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
6. 加入 10ml 去蛋白液 PE（请先检查是否已加入无水乙醇！）12,000 x g 离心 1 分钟，弃掉废液。

- 加入 10ml 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 x g 离心 1 分钟, 弃掉废液。再加入 10ml 漂洗液 WB, 重复漂洗一次。
- 将吸附柱 DC 放回空收集管 CT 中, 最高速 (最好大于 12,000 x g) 离心 2 分钟以干燥基质膜上残留乙醇。

**该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇, 残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率, 降低质粒产量。**

- 取出吸附柱 DC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 1-2ml 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热可提高产量), 室温放置 2 分钟, 12,000 x g 离心 1-2 分钟。

**推荐: 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 1 分钟, 12,000 x g 离心 1-2 分钟。洗脱两遍可提高浓度约 10%。**

**洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量 (最小不应少于 1ml)。**





---

**CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd**

Yizhuang Biomedical Park  
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China  
Tel: 010-56315162 [www.codonx.com](http://www.codonx.com)