

Plasmid Extraction Maxi Kit

质粒 DNA 大提试剂盒

本产品适合于从 50~200ml 细菌培养液中提取高达 1000 μ g 的质粒 DNA。实验流程可在 60 分钟内完成，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。本试剂盒采用碱裂解法进行裂解，通过 DNA 柱于高盐条件下特异性结合 DNA 的特点，达到纯化的目的。纯化的质粒可直接用于酶切、PCR、测序、连接、转化和标记等。

产品组份

产品编号	DP104-01 (10 T)	DP104-02 (50 T)
RNase Solution	750 μ l	2 \times 2 ml
Buffer S1	150 ml	2 \times 375 ml
Buffer S2	150 ml	2 \times 375 ml
Buffer S3	200 ml	2 \times 500 ml
Buffer W1P	75 ml	375 ml
Buffer W2P	25 ml	3 \times 40 ml
Buffer EB	25 ml	125 ml
DNA Extraction Maxi Column	10	50
50 ml Collection Tube	10	50

保存条件

本产品除酶制品外，可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月。低温下，Buffer S2 可能会有沉淀形成，需 37 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于 -20 $^{\circ}$ C，试剂盒使用前，短暂离心 RNase Solution，之后将试剂盒提供的 RNase Solution 全部加入至 Buffer S1 中，并保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

注意 事 项

- Buffer S1 使用前先将 RNase Solution 进行短暂离心，之后全部加入，保存于 2-8°C。
- Buffer W2P 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- 以下离心步骤均在室温进行（20-25°C）
- Buffer S2 及 Buffer S3 对皮肤有一定腐蚀性，不可直接接触。
- Buffer S2 在低温会有白色沉淀析出，须 37°C 水浴让沉淀完全溶解后再使用，否则会造成产量波动。

实 验 步 骤

1. 取 50~200ml 过夜培养的培养液至离心管中，8000 × g 离心 3 分钟，收集菌体。
若菌液量多，可通过多次离心弃培养液富集菌体。
2. 倒弃培养基，尽量吸尽残液。加入 12ml Buffer S1（确保已经加入 RNase Solution），高速涡旋重悬沉淀直至看不到细菌团块。
3. 往重悬液中加入 12ml Buffer S2，颠倒混匀 10~20 次，室温静置 2 分钟。
该步骤不可采用涡旋代替颠倒，否则导致基因组 DNA 被打断，提取的质粒中带有基因组 DNA 片段。充分裂解后溶液颠倒应明显有粘稠感觉且表现透亮。
4. 加入 17ml Buffer S3，立即颠倒 10~15 次让溶液彻底中和使白色沉淀充分分散。
5. 8,000 × g 离心 10 分钟，上清液待用。
6. 将 DNA Extraction Maxi Column 装在 50ml 收集管中。转移 20ml 上清液至柱子中，8,000 × g 离心 1 分钟。
若未充分过柱，可延长离心时间。
7. 重复第 6 步直至所有上清过柱。
8. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 6ml Buffer W1P 至柱子中。8,000 × g 离心 1 分钟。
该步骤可去除核酸酶，因此对核酸酶丰富的菌株不能省略此步骤，其余菌株可省略此步骤。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 10ml Buffer W2P（确保无水乙醇已加入）。8,000 × g 离心 30 秒。

10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 10ml 无水乙醇。8,000 × g 离心 30 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。8,000 x g 离心 10 分钟干燥柱子，转移柱子至新的 50ml 离心管（自备）中，打开盖子室温干燥 10 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 100μl 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

12. 加入 800-1500μl Buffer EB 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，8,000 × g 离心 5 分钟洗脱 DNA。
13. （可选）将离心得到的洗脱液重新加入至柱子膜中央，静置 1 分钟，8,000 × g 离心 5 分钟洗脱 DNA。

洗脱体积较小时，可增加该步骤提高回收效率。

14. 弃去柱子，把质粒保存于-20°C。

常见问题

1. RNA 污染

- 菌种 RNA 含量较高，加入 Buffer S1 后室温放置 5 分钟充分消化 RNA
- Buffer S1/RNase Solution 放置 2-8°C 保存勿超半年。

2. DNA 产量低

- 菌种问题：菌种保存过程中容易出现质粒丢失现象，建议养菌前进行平板活化。
- 菌体应该在 Buffer S1 中充分重悬。
- Buffer W2P 没有加入乙醇稀释。
- 加入 Buffer S3 后应立即颠倒混匀。
- 加入 Buffer S2 裂解后溶液浑浊：菌液量加入较多，减少菌液用量。
- 菌液为低拷贝菌液：可提高菌液用量至 30ml，等比例增加 Buffer S1/S2/S3 的用量进行提取，并且进行 2 次洗脱，洗脱液进行 70°C 预热，其余提取步骤一致。