

版本号:130918

EndoFree Plasmid Maxi Kit

无内毒素质粒大量快速提取试剂盒

目录号: PL13

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	10次(PL1301)
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	750µl
溶液 P1	4℃	77 ml
溶液 P2	室温	77 ml
溶液 N3	室温	77 ml
内毒素清除剂	-20℃	25 ml
去蛋白液 PE	室温	63 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	25 ml X 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	室温	10 个
收集管 (50ml)	室温	10 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

内毒素清除剂常温运输, 4 度可以保存一个月, 长期保存放-20℃。

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 100ug/ml) 置于 4℃ 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. 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℃ 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。
3. 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：

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，粗提物通过独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素，然后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。

❖ 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 150-300 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 %。
3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低 (<0.1 EU/ μ g DNA)，细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

❖ 注意事项

1. **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 50 ml转头的台式离心机。
2. 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、N3 的用量，洗脱缓冲液应在70℃预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
3. 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。**公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%。**
4. **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。

5. **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，质粒应该保存在-20℃。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。

❖ **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 2 瓶漂洗液 WB 瓶中分别加入 100 ml 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 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃ 保存。

1. 取 150-200 ml (最多不超过 300 ml)过夜培养的菌液，12,000xg (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 7.5 ml 溶液 P1 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 7.5 ml 的溶液 P2，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 7.5 ml 溶液 N3，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，避免吸取到漂浮白色沉淀。
加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. 加入 0.1 体积(上清的体积的 10%，约 2.4ml)的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀，冰浴或者插入碎冰中(或冰箱冷冻室)放置 5 分钟直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间偶尔混匀几次。
内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮（或稍浑浊）。

6. 常温放置 3-5 分钟，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。
如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42℃水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
7. 室温 8,000-10,000 x g 离心 10 分钟分相。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。
8. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇（约 11ml）后充分颠倒混匀后分多次（每次不超过 10 ml，因个别情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 ml，以防产生漏液现象）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。
9. 加入 10 ml 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。
此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。
10. 加入 10 ml 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。
11. 将吸附柱 DC 放回空收集管中，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。
12. 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 1-2 ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃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）。