

版本号:130808

EndoFree Plasmid Mini Kit

无内毒素质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PL04

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PL0402)
平衡液	室温	5ml
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	150μl
溶液 P1	4℃	15 ml
溶液 P2	室温	15 ml
溶液 N3	室温	15 ml
		16 ml
去蛋白液 PE	室温	第一次使用前按说明加指定量乙醇
内毒素清除剂	-20℃	5ml
		15 ml
漂洗液 WB	室温	第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 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, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 2-8℃ 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 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,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。

❖ 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. 独特工艺配方清除内毒素,内毒素含量极低 (<0.1 EU/ μg 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. 所有的离心步骤均在室温完成,使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机,如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒,建议**接种单菌落于1.5-4.5 ml加合适抗生素的LB培养基,过夜培养14-16个小时**,可提取出多达20 μg -50 μg 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10kb的大质粒,应适当加大菌体使用量,使用5-10 ml过夜培养物,同时按比例增加P1、P2、N3的用量,其它步骤相同。
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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 。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。

❖ 关于平衡液的使用

1. **介绍:** 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团, 提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液, 若不小心碰到, 请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖, 以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成, 请加热至 37℃使沉淀完全消失。
2. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中, 吸取 100 μ l 的平衡液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱子重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 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 P1 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8℃保存。

1. 取 1.5-4.5 ml 过夜培养的菌液, 12,000rpm 离心 30 秒, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。

收集超过 1.5 ml 菌液, 可以离心弃上清后, 在同一个 1.5ml 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 250 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 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 250 μ l 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 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。

4. 加 250 μ l 溶液 N3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀时会出现白色絮状沉淀。13,000rpm 离心 10 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 80 μ l)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 14,000 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。

平衡液预处理吸附柱：

使用平衡液预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤，具体方法参见前文“关于平衡液的使用”

8. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇（约 370 μ l）后充分颠倒混匀后分两次（每次不超过 700 μ l）转入吸附柱 AC 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 500 μ l 去蛋白液 PE，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液。

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 DH5 α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

10. 加入 600 μ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。再加入 600 μ l 漂洗液 WB，重复漂洗一次。

11. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

12. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，离心 1 分钟。

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，但是最小体积不应少于 30 μ l，体积小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。