

版本号: DP170320

EndoFree Maxi Plasmid Kit V2

无内毒素质粒大提试剂盒 (增强型)

(离心柱型)

目录号: DP120

产品内容

产品组成	DP120-01 (10 preps)
平衡液BL (Buffer BL)	30 ml
溶液P1 (Buffer P1)	125 ml
溶液P2 (Buffer P2)	125 ml
溶液P4 (Buffer P4)	125 ml
去内毒素溶液ER (Endotoxin Removal Buffer ER)	32 ml
缓冲液ED (Buffer ED)	220 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	50 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.25 ml
过滤器CS1 (Filtration CS1)	10个
吸附柱CP6 (Spin Columns CP6)	10个
收集管 (50 ml) (Collection Tubes 50 ml)	20个

储存条件

该试剂盒置于室温(15-25℃)干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下, 若溶液产生沉淀, 使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间, 必要时可在37℃水浴中预热10 min, 以溶解沉淀。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中, 混匀后置于2-8℃保存, 可稳定保存12个月以上。单独包装的RNase A 在室温可稳定保存12个月以上。

产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒DNA。同时采用特殊的去内毒素溶液ER和过滤器CS1，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需1h，方便快捷。使用本试剂盒提取的质粒DNA可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

推荐每次菌液使用量：高拷贝质粒推荐使用量为100 ml，得率一般在500-1500 μg 左右；低拷贝质粒推荐使用量为200 ml，得率一般在50-300 μg 左右。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液P1在使用前先加入RNase A (将试剂盒中提供的RNase A全部加入)，混匀，置于2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
2. 使用前先检查平衡液BL、溶液P2和P4是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 注意不要直接接触溶液P2和P4，使用后应立即盖紧盖子。
4. 使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出，避免滤膜因压力而松动。
5. 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10 kb的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加溶液P1、P2、P4的用量；洗脱缓冲液TB推荐在65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热。可以适当延长吸附和洗脱时间，以提高提取效率。
6. 实验前使用平衡液BL处理吸附柱，可以最大限度激活硅基质膜，提高得率。
7. 用平衡液处理过的柱子最好立即使用，放置时间过长会影响使用效果。

质粒DNA浓度及纯度检测

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 双链DNA。纯化的质粒DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀通常在1.8-2.0左右，可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对DNA纯度要求很高的实验中。

操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱CP6中（吸附柱放入50 ml收集管中）加入2.5 ml的平衡液BL，8,000 rpm (~8,228 × g)离心2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
（用平衡液处理过的柱子最好立即使用）。
 2. 取100 ml（根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用200 ml）过夜培养的菌液加入离心管，室温8,000 rpm (~8,228 × g)离心3 min收集细菌，尽量吸除上清。
注意：菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌液量以能够充分裂解为佳，菌液过多会导致裂解不充分从而降低质粒的提取效率。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10 kb的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加溶液P1、P2、P4的用量。
 3. 尽量吸除上清，为确保上清液全部吸取，请用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。
 4. 向留有菌体沉淀的离心管中加入10 ml溶液P1（请先检查是否已加入RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。
注意：请务必彻底悬浮细菌沉淀，如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解效果，导致提取量和纯度偏低。对于低拷贝质粒，加大菌体用量的同时按比例增加P1、P2、P4的用量。
 5. 向离心管中加入10 ml溶液P2，立即温和地上下翻转6-8次，使菌体充分裂解，室温放置5 min。
注意：温和地混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，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。
 6. 向离心管中加入10 ml溶液P4，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置10 min左右。8,000 rpm (~8,228 × g)离心5-10 min，使白色沉淀离至管底（可适当增加离心时间），将全部溶液小心倒入过滤器CS1中（请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器），慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的50 ml的管中（自备）。
注意：加入溶液P4后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤器CS1中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多（>100 ml），推荐延长离心时间至20-30 min。
 7. 加入3 ml红色的去内毒素溶液ER，颠倒混匀后溶液呈现出均匀透明的黄色。
可选步骤：如果需要达到更低的内毒素水平，可以将混匀后的上述溶液冰浴20 min后，42℃水浴5 min，5000 rpm离心3 min，将上清转移到一个全新的50 ml离心管中。
-

-
8. 对于高拷贝质粒加入0.3倍上述滤液体积的异丙醇，对于低拷贝质粒加入0.2倍上述滤液体积的异丙醇 (**加入异丙醇过多容易导致RNA污染**)，上下颠倒混匀后转移到吸附柱CP6中 (**吸附柱放入50 ml收集管中**)。

注意：吸附柱CP6的最大容量为15 ml，所以需要分2次过柱。个别情况下离心机转子倾角较大，此时，建议加入吸附柱CP6的溶液体积不超过10 ml，以防产生漏液现象。

9. 室温8,000 rpm (~8,228 × g) 离心2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP6重新放回收集管中。

注意：将第8步中所得溶液分2次过柱，每次均按以上条件操作。

10. 向吸附柱CP6中加入10 ml缓冲液ED，8,000 rpm (~8,228 × g) 离心2 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

11. 对于低拷贝质粒，重复操作步骤10一次。

12. 向吸附柱CP6中加入10 ml漂洗液PW (**请先检查是否已加入无水乙醇**)，8,000 rpm (~8,228 × g) 离心2 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

13. 重复操作步骤12一次。

14. 将吸附柱CP6重新放回收集管中，8,000 rpm (~8,228 × g) 离心5 min，然后将吸附柱CP6开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等) 实验。

15. 将吸附柱CP6置于一个干净的50 ml收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加1-2 ml洗脱缓冲液TB，室温放置5 min，然后室温8,000 rpm (~8,228 × g)离心5 min。将50 ml离心管中的洗脱液全部移入一个干净的1.5 ml离心管，-20℃保存。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤13。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用ddH₂O做洗脱液应保证其pH值在7.5-8.0范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量的多少主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定。洗脱缓冲液体积不少于1 ml，体积过小影响回收效率。DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。
