

版本号: DP150309

# EndoFree Midi Plasmid Kit

## 无内毒素质粒中量提取试剂盒

目录号: DP108

### 产品内容

产品组成	DP108 (10 preps)
平衡液BL (Buffer BL)	30 ml
溶液P1 (Buffer P1)	30 ml
溶液P2 (Buffer P2)	30 ml
溶液E3 (Buffer E3)	15 ml
溶液EBT (Buffer EBT)	70 ml
漂洗液GDE (Buffer GDE)	30 ml
漂洗液MRDE (Buffer MRDE)	36 ml
漂洗液PWF (Buffer PWF)	16 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml
RNase A (100 mg/ml)	150 $\mu$ l
过滤器CS1 (Filtration CS1)	10个
吸附柱CP7 (Spin Columns CP7)	10个
收集管(15 ml) (Collection Tubes 15 ml)	20个

### 储存条件

第一次使用前将RNase A加入溶液P1中, 混匀后置于2-8°C保存, 可稳定保存6个月。单独包装的RNase A在室温可稳定保存12个月。本试剂盒在室温(15-25°C)干燥条件下, 可保存12个月; 更长时间的保存可置于2-8°C。2-8°C保存时, 若溶液产生沉淀, 应在使用前置于37°C溶解沉淀。

---

## 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。同时采用特殊的溶液EBT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。

**推荐每次菌液用量：**高拷贝质粒推荐用量为50 ml，得率一般在250-750 µg左右；低拷贝质粒推荐用量为100 ml，得率一般在100-300 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°C保存。
  2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明现在漂洗液PWF和MRDE中加入无水乙醇。
  3. 使用前先检查平衡液BL、溶液P2、溶液E3和溶液EBT是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在37°C水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
  4. 注意皮肤不能直接接触溶液P2、E3和EBT，使用后应立即盖紧盖子。
  5. 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。
  6. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、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P1、P2、E3、EBT的用量；洗脱缓冲液推荐在65-70°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)。
  7. 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。
  8. 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。
-

---

## 操作步骤

使用前请先在漂洗液PWF和MRDE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CP7中（吸附柱放入15 ml收集管中）加入2 ml的平衡液BL，5,000 rpm(~4,500 xg)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20-50 ml（根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用100 ml）过夜培养的菌液加入离心管，室温5,000 rpm(~4,500 xg)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。

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2.5 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、E3和EBT的用量。

5. 向离心管中加入2.5 ml溶液P2，立即温和地上下翻转6-8次，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1.25 ml溶液E3，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2-3 min左右。5,000 rpm(~4,500 xg)离心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15 ml的管中（自备）。

**注意：**加入溶液E3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 (>50 ml)，推荐延长离心时间至20-30 min。

7. 向滤液中加入等体积溶液EBT，立即上下翻转7-10次，充分混匀。

8. 转移4 ml混合液至吸附柱CP7中（吸附柱放入15 ml收集管中），室温5,000 rpm(~4,500 xg)离心3 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP7重新放回收集管中。重复该步骤直至所有的混合液通过吸附柱CP7。

---

- 
9. 向吸附柱CP7中加入2 ml漂洗液GDE, 5,000 rpm(~4,500 xg)离心3 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
  10. 向吸附柱CP7中加入3 ml漂洗液MRDE (请检查是否已加入无水乙醇), 5,000 rpm(~4,500 xg)离心3 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
  11. 向吸附柱CP7中加入3.5 ml漂洗液PWF (请检查是否已加入无水乙醇), 5,000 rpm(~4,500 xg)离心3 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
  12. 重复操作步11。
  13. 5,000 rpm(~4,500 xg)离心10 min, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

**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。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 建议将吸附柱CP7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。

14. 将吸附柱CP7置于一个干净的15 ml收集管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加0.5-1 ml洗脱缓冲液TB, 室温放置2-3 min, 然后室温5,000 rpm(~4,500 xg)离心5 min。将15 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ddH<sub>2</sub>O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0.5 ml, 体积小影响回收效率。DNA产物应保存在-20℃, 以防DNA降解。

## 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。OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50 μg/ml 双链DNA。纯化的质粒DNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>通常在1.7-1.9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。

---