

版本号: DP140606

EndoFree Mini Plasmid Kit II

无内毒素质粒小提中量试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP118

产品内容

产品组成	DP118-02 (50 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P4 (Buffer P4)	30 ml
去蛋白液PD (Buffer PD)	30 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	15 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml
RNaseA (10 mg/ml)	300 μ l
过滤柱CS (Filtration Columns CS)	50个
吸附柱CP4 (Spin Columns CP4)	50个
收集管(2 ml) (Collection Tubes 2 ml)	100个

储存条件

本试剂盒在室温（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℃。（注意：当低温贮存时，使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在37℃水浴中预热10 min，以平衡溶液温度）。单独包装的RNaseA在室温可稳定保存12个月以上。加入RNaseA后的溶液P1应置于2-8℃保存，可稳定保存6个月。

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P4和过滤柱CS，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需1个小时，方便快捷。以下操作步骤适用于提取5-15 ml过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒DNA可适用于转染多种细胞及各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

提取得率

质粒类型	菌液量	得率	质粒
低拷贝	5-15 ml	5-25 µg	pBR322, pACYC及其衍生载体, pSC101
			及其衍生载体, SuperCos, pWE15
高拷贝	5-15 ml	15-70 µg	pTZ, pUC, pBS, pGM-T

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RNaseA（将试剂盒中提供的RNaseA全部加入），混匀，置于2-8℃保存。
 2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液PW中加入无水乙醇。
 3. 使用前先检查平衡液BL、溶液P2和P4是否出现浑浊，如有混浊现象，可在37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
 4. 注意不要直接接触溶液P2和P4，使用后应立即盖紧盖子。
 5. 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心，速度为12,000 rpm (~13,400×g)。
 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、P4的用量，洗脱缓冲液应在65-70℃预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
 7. 实验前使用平衡液处理吸附柱，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当天使用，放置时间过长会影响效果。
-

操作步骤

1. 柱平衡步骤：向吸附柱CP4中（吸附柱放入收集管中）加入500 μl 的平衡液BL，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

2. 取5-15 ml过夜培养的菌液加入离心管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心1 min，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，菌体量以能够充分裂解为佳，过多的菌体裂解不充分会降低质粒的提取效率。

3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入500 μl 溶液P1（请先检查是否已加入RNaseA），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，导致提取量和纯度偏低。

4. 向离心管中加入500 μl 溶液P2，温和地上下翻转6-8次使菌体充分裂解。

注意：温和地混合，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，所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。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。

5. 向离心管中加入500 μl 溶液P4，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，然后室温放置10 min左右，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心10 min，此时在离心管底部形成沉淀。

注意：P4加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

6. 将上一步收集的上清液分次加入过滤柱CS（过滤柱放入收集管中），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心2 min，滤液收集在干净的2 ml离心管中（自备）。

7. 向滤液中加入0.3倍滤液体积的异丙醇（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CP4中（吸附柱放入收集管中）。

注意：过滤后滤液会损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱CP4的最大容积为700 μl ，所以需要分次过柱。

8. 室温12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：将第7步中所得溶液分次过柱，每次均按以上条件操作。

-
9. 向吸附柱CP4中加入500 μl 去蛋白液PD, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CP4放入收集管中。
 10. 向吸附柱CP4中加入600 μl 漂洗液PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CP4放入收集管中。
注意: 加入漂洗液PW后, 如果室温静置2-5 min, 有助于更好地去除杂质。
 11. 向吸附柱CP4中加入600 μl 漂洗液PW, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min, 倒掉收集管中的废液。
 12. 将吸附柱CP4重新放回收集管中, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心2 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CP4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。
 13. 将吸附柱CP4置于一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加100-300 μl 洗脱缓冲液TB, 室温放置2 min, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$)离心1 min将质粒溶液收集到离心管中。
注意: 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, 重复步骤12。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液, 应保证其pH值在7.0-8.5范围内, pH值低于7.0会降低洗脱效率。洗脱缓冲液体积不应少于100 μl , 体积小影响回收效率。且DNA产物应保存在 -20°C , 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。电泳可能为单一条带, 也可能为2到3条DNA条带, 这主要与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。OD260值为1相当于大约50 $\mu\text{g/ml}$ 双链DNA。

OD260/OD280比值应为1.7-1.9, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水, 比值会偏低, 但并不表示纯度低, 因为pH值和离子存在会影响光吸收值。
