

产品简介

本试剂盒采用独特的离子交换吸附技术，高效专一地结合质粒DNA。同时采用特殊的溶液P4和溶液TER，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质。使用本试剂盒与传统硅基质膜方法比较，所提取的质粒DNA完整性更好、内毒素水平更低，纯度更高，RNA残留更低，适合于包括酶切、PCR、测序、连接、转化、细胞转染和显微注射等多种分子生物学、细胞学实验。

本试剂盒吸附柱Tip2500采用预装离子交换柱形式，利用重力流原理吸附过滤液中质粒DNA，操作简便，无离心剪切力的损伤，可提取10 kb以上的大质粒。

推荐每次菌液使用量：高拷贝质粒推荐使用量为500-750 ml，得率一般在2.5-4.5 mg左右；低拷贝质粒推荐使用量为1-2.5 L，得率一般在500-700 µg左右。

自备试剂及耗材：无水乙醇、异丙醇、100 ml离心管、无菌的蓝盖瓶等。

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. 使用前先检查平衡液 TBT、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°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，应 5 倍增加菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、P4 和 TER 的用量，TC、TN 的用量不变。
6. **实验前使用平衡液 TBT 处理吸附柱，可以最大限度激活硅胶粉，提高得率。**用平衡液 TBT 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 µg/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

1. **柱平衡步骤：**向吸附柱 Tip2500 中加入 35 ml 平衡液 TBT，通过重力作用使平衡液 TBT 流过吸附柱，待吸附柱 Tip2500 中的平衡液 TBT 流尽后，弃平衡液 TBT，吸附柱 Tip2500 备用 (**平衡液 TBT 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**)。
2. 取 0.5-1 L (根据培养菌体的浓度选择合适的量) 过夜培养的菌液加入离心瓶，室温 4,000 rpm (~8,228×g) 离心 20 min 收集细菌。
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瓶中，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瓶中加入 70 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，建议 5 倍体积增加菌体用量，同时按比例增加 P1、P2、P4 和 TER 的用量。
5. 向离心瓶中加入 70 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 3 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. 向离心瓶中加入 70 ml 溶液 P4 (**溶液 P4 提前预冷**)，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，室温放置 10 min 左右。4°C 8,000 rpm (~8,228×g) 离心 20~30 min，使白色沉淀离心至管底 (**可适当增加离心时间**)，取离心液上清加入到过滤器 CS1 中进行过滤 (**请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器**)，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净无菌的蓝盖瓶中 (自备)。
注意：加入溶液 P4 后应立即混匀，避免产生局部沉淀。
7. 向滤液中加入 0.1 倍滤液体积的去内毒素溶液 TER (约 17.5 ml)，颠倒混匀，冰上孵育 30min。
8. 将步骤 7 中混合液分批小心倒入吸附柱 Tip2500 中，至所有溶液流过，弃流出液。
9. 取 300 ml 漂洗液 TC 加入至吸附柱 Tip2500，至所有溶液流过吸附柱，弃流出液。
10. 取一个干净的 100 ml 离心管 (自备) 用于收集洗脱液，向吸附柱 Tip2500 加入 50 ml 洗脱液 TN 至所有溶液流过吸附柱。



TIANGEN官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动



Order: 010-59822688
Toll-free: 800-990-6057 /400-810-6057
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: DP190226

EndoFree Mega Plasmid Kit (2.5 mg)

离子交换法无内毒素质粒大提试剂盒 (2.5 mg)

目录号: DP121

- 向步骤 10 的溶液中加入 0.7 倍洗脱液体积的异丙醇 (约 35 ml)，充分混匀，然后平分至两个 50 ml 收集管中准备离心。
- 步骤 11 中的混合液于 4°C 下 10,000 rpm 离心 30 min (转速应不少于 8000 rpm)，小心倒掉上清。
注意：可以在离心管上标记沉淀的位置，倒去上清时避免沉淀损失。
- 向收集管中加入 10 ml 70% 的乙醇漂洗沉淀，并于 4°C 下 10,000 rpm 离心 15 min，收集沉淀，小心倒掉上清。
- 用枪头弃去管底残留液体，室温干燥 10-15 min。
- 加入 1-2 ml 的洗脱缓冲液 TB 溶解质粒，并于适当条件保存。

产品内容

产品组成	DP121-01 (1 prep)	DP121-02 (5 preps)
溶液P1 (Buffer P1)	100 ml	400 ml
溶液P2 (Buffer P2)	100 ml	400 ml
溶液P4 (Buffer P4)	100 ml	400 ml
去内毒素溶液TER (Buffer TER)	20 ml	100 ml
平衡液TBT (Buffer TBT)	40 ml	200 ml
漂洗液TC (Buffer TC)	3 x 100 ml	3 x 500 ml
洗脱液TN (Buffer TN)	50 ml	300 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml	30 ml
RNase A (100 mg/ml)	150 µl	500 µl
吸附柱Tip2500 (Column Tip2500)	1 个	5 个
过滤器CS1 (Filtration CS1)	4 个	20 个
收集管(50 ml) (Collection Tubes (50 ml))	2 个	10 个

储存条件

该试剂盒置于室温(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段时间，必要时可在37°C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°C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。