

Endofree Midi Plasmid Kit

无内毒素质粒小提中量试剂盒

目录号

DNE57-01

试剂盒组成

Component	DNE57-01 (50 preps)
Buffer BL	10 ml
Buffer P1	25 ml
Buffer P2	25 ml
Buffer P4	25 ml
Buffer WB1	25 ml
Buffer WB2	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer EB	15 ml
Endotoxin RS	10 ml
RNase A (25 mg/ml)	100 µl
Spin Columns DC with Collection Tubes	50

保存方法

- 1、内毒素清除剂常温运输，-20℃保存，其他组分室温（15-30℃）保存。
- 2、第一次使用前将 RNase A 全部加入到溶液 P1 中（终浓度 100 µg/ml），混匀后置于 4℃保存。
- 3、储存环境温度低时 Buffer P2 中的 SDS 可能会沉淀，可在 37℃水浴加热 10 min，重新溶解后使用。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

本试剂盒采用碱裂法裂解细胞，内毒素清除剂选择性结合离心去除内毒素，再通过离心吸附柱在高盐状态下特异性结合溶液中的 DNA，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 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

注意事项（请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项）

- 1) 使用前先检查平衡液 BL、Buffer P2 和 P4 是否出现浑浊，如果有浑浊现象，可在 37°C 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
- 2) 不要直接接触溶液 P2 和 P4，使用后应立即盖紧盖子。
- 3) 所有离心步骤均使用台式离心机室温下进行，转速为 12,000 rpm (~13,400×g)。
- 4) 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
- 5) 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。
- 6) 用平衡液处理的柱子最好当天使用，放置时间过长会影响效果。
- 7) Buffer P1 在使用前先加入 RNase A 溶液（将试剂盒提供的 RNase A 全部加入，终浓度 100 µg/ml），混匀后 4°C 保存。
- 8) 第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！

标准抽提步骤

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 DC 中（吸附柱放入收集管内）加入 200 µl Buffer BL，12,000 rpm (~13,400×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 (~13,400×g) 离心 1 min，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

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. 向菌体沉淀中加入 500 µl Buffer 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沉淀。

注意：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 μ l Buffer 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，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片断。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 μ l Buffer P4，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 10 min，小心取上清至新的离心管。
注意：Buffer 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. 加入 0.1 体积（上清体积的 10%， \sim 160 μ l）的内毒素清除剂，颠倒混匀，冰浴（或放置冰箱冷冻室）5 min 直至浑浊变清亮透明（或仍稍有浑浊），中间偶尔混匀几次。
注意：加入内毒素清除剂后上清会变得浑浊，冰浴后应恢复清亮或稍有浑浊。
 7. 室温放置 3-5 min 回温，温度恢复至室温后溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。
注意：如果室温较低，也可 37-42 $^{\circ}$ C 水浴加快回温。
 8. 室温下 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 10 min，溶液分相。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其他杂质。将含 DNA 的上层水相转移至新的离心管（不要吸到蓝色油状）。
 9. 向上层水相中加入 0.5 倍体积异丙醇（ \sim 740 μ l），充分颠倒混匀，分多次（每次不超过 720 μ l）转移到 Spin Columns DC 中，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 DC 放回收集管中。直到所有混合液通过此吸附柱。
 10. 向吸附柱 DC 中加入 500 μ l Buffer WB1，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 min，弃废液，将吸附柱 AC 重新放回收集管中。
 11. 向吸附柱 DC 中加入 600 μ l 漂洗液 Buffer WB2（**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 AC 放回收集管中。
 12. 重复操作步骤 11。
 13. 将吸附柱 DC 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液。
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 AC 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 DC 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 100-200 μ l Buffer EB（EB 提前在 65 $^{\circ}$ C 预热可增加产量），室温放置 2-5 min，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离
-

心 1 min 收集质粒溶液。

注意: 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入吸附柱中, 室温放置 2 min, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min 收集质粒溶液。如果需要质粒浓度较高, 可适当减少洗脱体积, 但最小体积不应小于 100 μl。若用 ddH₂O 做洗脱液应确保其 PH 值在 7.0-8.5 范围内, PH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。