

# 无内毒素高纯度质粒小量快速提取试剂盒

## EndoFree HighPure Rapid Mini Plasmid Kit



### 产品信息:

		DP103-01
试剂盒组成	保存	50 次
平衡液 BL	室温	30ml
RNaseA (10mg/ml)	室温	150μl
溶液 P1	4℃	15ml
溶液 P2	室温	15ml
溶液 P3	室温	20ml
去蛋白液 PD	室温	15ml
漂洗液 WB	室温	15ml
		第一次使用前加入 60ml 无水乙醇
过滤柱 E	室温	50 个
洗脱缓冲液 EB	室温	10ml
吸附柱 AC	室温	50 个
收集管 (2ml)	室温	50 个

**保存条件:** 本产品收到后按照上面指示温度存放各成份, 储存 18 个月不影响使用效果。

### 产品介绍:

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞, 粗提物通过过滤柱除去内毒素, 然后离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA, 再通过去蛋白液和漂洗液将杂质和其它细菌成分去除, 最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

### 产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 独有的去蛋白液配方, 可以高效去除核酸酶。即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除。有效防止了质粒被核酸酶降解。
3. 独特内毒素清除方法, 清除内毒素效果一般小于 <math>0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}</math>。

### 注意事项:

- 1.第一次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100ug/ml）置于 4℃保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 2.环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- 3.避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。
- 4.溶液 P3 和去蛋白液 PD 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
- 5.提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒建议**接种单菌落于 1.5-4.5ml 加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 14-16 个小时**，可提取出多达 20μg 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10kb 的大质粒，应适当加大菌体使用量，使用 5-10ml 过夜培养物，同时按比例增加 P1、P2、P3 的用量，其它步骤相同。
- 6.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 50μg/ml DNA。**电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带**，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。**
- 7.质粒 DNA 确切分子大小，**必须酶切线性化后**，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。

**自备试剂：**无水乙醇

#### **操作步骤：**

##### **提示：**

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ⇒ 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃保存。

- 1.向吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中)加 500μl 的平衡液 BL, 12,000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 2.取 1.5-4.5 毫升过夜培养的菌液 12,000rpm 离心 30sec, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。
- 3.用 250μl 溶液 P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。
- 4.加 250μl 的溶液 P2, 温和地上下翻转 4-7 次（裂解时间**不超过 5min**）使菌体充分裂解。

- 5.加 350 $\mu$ l 溶液 P3, **立即**温和地上下翻转 4-7 次, 充分混匀, 此时会出现白色絮状沉淀, 12,000rpm 离心 5 min。
- 6.将上清加入到过滤柱 E 中(过滤柱放入 1.5ml 或 2ml 离心管中), 12,000rpm 离心 2 min, 收集液体。如上清量较大, 请分两次离心。
- 7.将上述液体转入吸附柱 AC 中(吸附柱放入收集管中), 12,000rpm 离心 30-60 sec, 倒掉管中的废液。  
**可选步骤: 所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株时, 由于核酸酶含量丰富, 应加入 500 $\mu$ l 去蛋白液 PD, 12,000rpm 离心 30-60 sec, 弃废液。**
- 8.加入 500 $\mu$ l 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30-60 sec 弃掉废液。
- 9.重复步骤 8。
- 10.将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 min, 将吸附柱置于室温放置数 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
- 11.取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 室温放几分钟。
- 12.在吸附膜的中间部位加 50 $\mu$ l-100 $\mu$ l 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 min, 12,000rpm 离心 1 min。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1 min。(注意: 若用 ddH<sub>2</sub>O 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 50  $\mu$ l, 体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}$ C, 以防 DNA 降解。)

BM190307