

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:

试剂盒组成	保存	DP103-01
		50 次
RNase A (干粉)	室温	1 支
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 <0.1 EU/μg。

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 100 μ g/ml) 置于 4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 20 μ g 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 50 μ g/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。本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 (干粉) 倒入溶液 P1 中并使用 P1 冲洗离心管, 混匀, 每次使用后置于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

1. 取 1.5-4.5ml 过夜培养的菌液 12,000rpm 离心 30sec, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。
2. 用 250 μ l 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 涡旋振荡至彻底悬浮。
3. 加 250 μ l 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。
4. 加 350 μ 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。

5. 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。**

6. 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，弃废液。

7. 加入 500μl 去蛋白液 PD，12,000rpm 离心 30-60sec，弃废液。

此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤；如所用菌株为 XL-1 Blue 和 DH5α 等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

8. 加入 500μl 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，尽量除去漂洗液，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 50μl-100μl 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃ 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 ddH₂O 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 30 μl，体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。）

20241119