

Endofree Mini Plasmid Kit

无内毒素质粒小提试剂盒

目录号：DNE54

试剂盒组成

试剂盒组成	保存	DNE54-01 (50 次)	DNE54-02 (100 次)
Buffer BL (平衡液)	室温	5 ml	10 ml
Buffer P1	室温/ 加入 RNase A 后 4°C	15 ml	25 ml
Buffer P2	室温	15 ml	25 ml
Buffer P4	室温	15 ml	25 ml
Endotoxin RS (内毒素清除剂)	-20°C	5 ml	10 ml
Buffer WB1 (蛋白去除液)	室温	25 ml	50 ml
Buffer WB2	室温	13 ml	25 ml
Buffer TE	室温	10 ml	20 ml
RNase A (10 mg/ml)	4°C	150 µl	250 µl
Onestep-Lysis [®] Columns AC	室温	50 个	100 个
Collection Tubes	室温	50 个	100 个
Manual		1 份	

第一次使用前按说明加指定量无水乙醇

保存方法

RNase A 常温运输，收到后 4°C 保存使用，-20°C 长期保存；内毒素清除剂常温运输，4°C 保存一个月，-20°C 可长期保存。其他组分室温干燥条件下保存 12 个月内效果稳定。第一次使用前将 RNase A 加入溶液 P1 中，混匀后置于 4°C 保存，可稳定保存 12 个月以上。

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

本试剂盒采用改进的碱裂法裂解细胞，内毒素清除剂选择性结合离心去除内毒素，离心吸附柱内的硅基质膜在高盐状态下特异性结合溶液中的质粒 DNA，适用于提取 1-5 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。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，使用 5-10 ml 过夜培养物，同时按照比例增加 P1、P2、P4 的用量，洗脱缓冲液应在 65-70°C 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。。
- 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 AC 中（吸附柱放入收集管内）加入 100 µl 平衡液 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 1-5 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。
➤ 菌液超过 1.5 ml 时，可以离心弃上清后，在同一个离心管内加入更多的菌液，重复步骤 2，直到收集到足够的菌体。

3. 向菌体沉淀中加入 250 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。
 - 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 250 μl Buffer P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。
 - 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 250 μl 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。
 - 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%， $\sim 80 \mu\text{l}$ ）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。
 - 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。
 - 如果室温较低，也可 37-42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加快回温。
8. 室温 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 ($\sim 370 \mu\text{l}$)，充分颠倒混匀，分两次（每次不超过 700 μl ）转移到 Onestep-Lysis[®] Columns AC 中（吸附柱 AC 放入收集管中），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 AC 放回收集管中。直到所有混合液通过此吸附柱。
10. 向吸附柱 AC 中加入 500 μl Buffer WB1（蛋白去除液），12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 30 s，弃废液，将吸附柱 AC 重新放回收集管中。
11. 向吸附柱 AC 中加入 600 μl 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 30 s，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 AC 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，尽量除尽漂洗液。

➤ 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 AC 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μl Buffer TE（TE 提前在 65 $^{\circ}\text{C}$ 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。

➤ 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（ $\sim 13,400\times g$ ）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 50 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。
