

## 无内毒素质粒小提试剂盒

## EndoFree Plasmid MiniPrep Kit

(离心柱型)

目录号: QYM10016

## 产品包装

产品组成	保存	QYM10016-50
RNase A (10 mg/ml)	-20℃	150 ul
ToxinOut Buffer	-20℃	5 ml
Buffer BL	室温	5 ml
Solution I	室温	15 ml
Solution II	室温	15 ml
Solution III	室温	15 ml
Buffer PE	室温	16 ml
Buffer WB2	室温	13 ml
Buffer EB	室温	15 ml
MiniSpin Column With Collection Tubes	室温	50 套

(注意: 使用前将全部 RNase A 溶液加到 Solution I 中混合均匀, 2 ~ 8℃ 保存; 按要求在 Buffer WB2 中加入无水乙醇)

## 保存条件

在室温(15 ~ 25℃)干燥条件下, 可保存 12 个月。 RNase A、ToxinOut Buffer, 可常温运输, -20℃ 保存。

## 产品简介

无内毒素质粒小提试剂盒采用改进的 SDS-碱裂解法裂解细胞, 通过独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素, 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。所得质粒可直接用于酶切、转化、PCR、RT-qPCR、测序及转染等分子生物学实验。

## 产品特点

1. 独特工艺配方清除内毒素, 内毒素含量极低 (< 0.1 EU/ug DNA), 细胞转染效果极佳。
2. 得率高: 1.5 - 4.5ml 菌液可提出多达 20 - 50 ug 的纯净质粒

## 注意事项

1. 使用前请先检查 Buffer BL、Solution II 和 Solution III 是否出现浑浊, 如有混浊现象, 可在 37℃ 水浴中加热几分钟, 即可恢复澄清。

2. 第一次使用前，请先在 Buffer PE、Buffer WB2 中加入无水乙醇，请参照瓶上的标签。
3. 首次使用时请先将 RNase A 全部加到 Solution I 中，混匀，每次使用后置于 2~8℃ 保存。

#### 操作步骤：

1. 柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 100 ul 的 Buffer BL，12,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。
2. 取 1~5 ml 过夜培养的菌液，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，尽量倒干上清，收集菌体。（注意：根据菌液的浓度决定取液量，浓度高时取 1.5 ml 菌液离心即可，浓度低时可多收集一次）
3. 加入 250 ul Solution I，重悬菌体沉淀，涡旋震荡至彻底悬浮。（注意：如有未彻底悬浮的菌块会影响裂解，导致提取的质粒浓度及纯度降低）
4. 加入 250 ul Solution II，温和地上下翻转 6-8 次，使菌体充分裂解，室温放置 4 min。（注意：不可剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 片段的污染，所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，可增加溶液 P2 的用量，在后续的操作中溶液 P3 的用量也要相应增加）
5. 加入 250 ul Solution III，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀，然后室温 13,000 rpm 离心 10 min，小心取上清至新管，避免吸到白色漂浮物。（注意：加入溶液 P3 后应立即混合，避免产生 SDS 的局部沉淀）
6. 加入 0.1 体积（上清的体积的 10%，约 80 ul）的 ToxinOut Buffer 到上一步所得上清，颠倒旋转混匀，冰浴或者插入碎冰中（或冰箱冷冻室）放置 5 分钟，直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间偶尔混匀几次。（注意：内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮，或稍浑浊。）
7. 常温放置 3~5 分钟，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。（37℃可加速浑浊）
8. 室温 15,000 rpm 离心 10 分钟分相。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。
9. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇（约 370 ul），充分颠倒混匀，分两次（每次不超过 700 ul）转入吸附柱中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm 离心 1min，质粒被吸附在膜上，倒掉收集管中的滤液，直到所有混合溶液通过此吸附柱。
10. 可选步骤：向吸附柱中加入 500 ul Buffer PE，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。（注意：去蛋白液 PE 为浓缩液，按要求加入无水乙醇，用后应立即盖紧瓶盖，以防酒精挥发）（注意：如果宿主菌是 endA<sup>-</sup>，如 DH5 $\alpha$ 或 TOP10，此步骤可省略。如果宿主菌是 endA<sup>+</sup>，如 TG1、BL21、HB101、JM101 等，此步骤不可省略，因这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒。如果提取低拷贝质粒也推荐采用此步骤）
11. 加入 600 ul Buffer WB2，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃滤液。（注意：漂洗液 WB 为浓缩液，按要求加入无水乙醇，用后应立即盖紧瓶盖，以防酒精挥发）
12. 重复步骤 11 一次。
13. 室温 12,000 rpm 离心 2 min，甩干残留液体，以免残留乙醇抑制下游反应。
14. 将吸附柱置于一个新的 1.5 ml 离心管（自备）中，加入 50~100 ul 的 Buffer EB，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，离心管底溶液即质粒 DNA。（注意：事先在 65~70℃ 水浴中预热洗脱缓冲液 EB，可增加洗脱效率；如果需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，再次离心 1 min 收集；如需使用去离子水洗脱，可用 NaOH 调整其 pH 值在 7.0-8.5 之间。）