

Endo free Mini Plasmid Kit Plus

无内毒素质粒小提中量提取试剂盒

目录号：AO3303

试剂盒组成

Component	AO3303 (50 T)	AO3303 (100 T)
Buffer BL	10 ml	20 ml
Buffer P1	25 ml	50 ml
Buffer P2	25 ml	50 ml
Buffer N3	25 ml	50 ml
Buffer ER	8 ml	15 ml
Buffer WB1	25 ml	50 ml
Buffer WB2 (concentration)	13 ml	25 ml
Buffer WB2 (concentration)	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)	(使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
Buffer EB	10 ml	20 ml
RNase A (10 mg/ml)	300 μ l	600 μ l
Spin Columns DC with Collection Tubes	50	100

储运方法

试剂盒所有组分常温运输，室温保存（15 - 25℃）

产品介绍

内毒素是质粒提取中常见的污染物，由于真核细胞对内毒素非常敏感，因此，如果质粒中含有内毒素会大大降低真核细胞转染效率。本试剂盒采用独特的硅基质膜吸附技术，高效专一的结合质粒DNA；同时采用特殊优化的碱裂解法裂解细胞，新型内毒素清除剂（ER）可有效的去除内毒素、蛋白等杂质，适用于提取5 - 15 ml 过夜培养的大肠杆菌。溶液包含指示剂，指示裂解、中和是否完全，实现操作的可视化，确保质粒提取的质量。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）

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，同时按照比例增加 P1、P2、N3 的用量，洗脱缓冲液应在 65 - 70 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。

第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入标签指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），混匀后可 4 保存 6 个月。如果 Buffer P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在 Buffer P1 中补加 RNase A 即可。

低温时先检查 Buffer P2 中是否出现沉淀析出，如果有沉淀析出，可在 42 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。

标准抽提步骤（以下离心步骤均在室温下进行）

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 ($\sim 13,400 \times g$) 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）

取 5 - 15 ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，10,000 rpm ($\sim 9,500 \times g$) 离心 1 min，尽可能的吸弃上清，收集菌体。

向菌体沉淀中加入 500 μl 红色 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，全部转移到 2 ml 离心管中以便于后续提取操作。

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。

加入 500 μl Buffer P2，温和地上下翻转 10 - 15 次使菌体充分裂解，溶液变成清亮红色，室温放置 2 - 3 min。

注意：温和地颠倒混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成产物中有基因组 DNA 污染。此时溶液应变成清亮黏稠的红色，所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏。如果菌体少，很快清亮黏稠后就可以做下一步。

加入 500 μl Buffer N3，立即温和地颠倒混匀直至红色完全消失，此时溶液呈黄色并有大量沉淀生成。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 10 min，吸取上清 ($\sim 1.5 \text{ ml}$) 至新的离心管。

注意：Buffer N3 加入后应立即混合，避免产生局部 SDS 沉淀。如果离心后上清中还有微小沉淀，不影响后续操作。

加入 150 μl Buffer ER，充分颠倒混匀，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 min，吸取上清 ($\sim 1.5 \text{ ml}$ ，可剩余少许上清以免吸到含有内毒素的黄色沉淀) 至新的离心管，此处推荐用 5 ml 或 15 ml 离心管。

加入 0.5 倍体积异丙醇 ($\sim 750 \mu\text{l}$)，充分混匀，转移到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DC) 中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，弃废液。

吸附柱最大容积 750 μl ，溶液应分多次上柱，直到所有混合液通过此吸附柱。

加入 500 μl Buffer WB1，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，弃废液。

加入 600 μ l 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, 弃废液。

重复操作步骤 9。

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 DC 开盖, 置于室温放置 2 - 3 分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

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 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 ($\sim 13,400 \times g$) 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 100 μ l。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。