

Endo free Max Plasmid Kit

无内毒素质粒大量提取试剂盒

目录号：

试剂盒组成

Component	A O 3 3 0 4 (2 T)	Z L 8 4 0 2 (1 0 T)
Buffer BL	1 0 m l	3 0 m l
Buffer P1	2 5 m l	8 0 m l
Buffer P2	2 5 m l	8 0 m l
Buffer N3	2 5 m l	8 0 m l
Buffer ER	5 m l	2 5 m l
Buffer WB1	2 5 m l	1 0 0 m l
Buffer WB2 (concentrate)	1 3 m l	2 5 m l x 2
Buffer WB2 (concentrate)	(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	1 0 m l	2 0 m l
RNase A (10 mg/ml)	3 0 0 μ l	8 0 0 μ l
Spin Columns HC with Collection Tubes	2	1 0
50 ml Collection Tubes	2	1 0

保存方法

试剂盒所有组分常温运输，室温保存（1 5 - 2 5℃）

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；同时采用新型内毒素清除剂（ER）快速去除内毒素、蛋白等杂质，内毒素水平可低于0.1 EU/μg，适用于提取100 - 200 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）

低温时先检查 Buffer P2 中是否出现浑浊，如果有浑浊现象，可在 42℃ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。

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。

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。

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 EB 中不含有螯合剂 EDTA 成分，不影响下游酶切、连接等反应。

标准抽提步骤

取 100 - 200 ml 过夜培养的菌液（根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐使用 200 ml），加入离心管中，10,000 rpm (~9,000×g) 离心 1 min，尽可能的倒干净上清，收集菌体。

▲如使用 50 ml 离心管，可以离心弃上清后，在同一个 50 ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

加入 8 ml 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。

▲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 8 ml Buffer P2，温和地上下翻转 10 - 15 次使菌体充分裂解，溶液应变成清亮红色，室温放置 4 - 5 min。

▲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的红色，所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏。如果未变成清亮红色，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

加入 8 ml Buffer N3，立即温和地上下翻转直至红色完全消失，此时溶液呈黄色并有大量沉淀生成。室温静置 5 min，10,000 rpm (~9,000×g) 离心 10 min，将上清液小心的倒入新的离心管中。（倒出的上清液体积约为 24 ml）

▲Buffer N3 加入后应立即混合，避免产生局部 SDS 沉淀。如果上清液中混有少量沉淀也不影响实验结果，后续提取过程中会去除。

加入 2.4 ml Buffer ER，充分颠倒混匀，10,000 rpm (~9,000×g) 离心 2 min，将上清液小心的倒入新的离心管中（可剩余少许上清以免倒出含有内毒素的黄色沉淀，倒出的上清液体积约为 24 ml）。

此时进行柱平衡步骤：向吸附柱 HC 中（Spin Columns HC）加入 2.5 ml Buffer BL，10,000 rpm (~9,000×g) 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（用平衡液处理过的吸附柱最好立即使用，放置时间过长会影响提取得率。）

向第5步上清液中加入0.5倍体积异丙醇（~12 ml），充分颠倒混匀，转移到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns HC）中，10,000 rpm（~9,000×g）离心1 min，弃废液。

▲推荐每次加入吸附柱的溶液体积为12 mL，溶液分3次过柱。

加入10 ml Buffer WB1，10,000 rpm（~9,000×g）离心1 min，弃废液。

加入10 ml Buffer WB2（请先检查是否已加入无水乙醇），10,000 rpm（~9,000×g）离心1 min，弃废液。

重复操作步骤9。

将吸附柱HC放回空收集管中，10,000 rpm（~9,000×g）离心3 min，尽量除去漂洗液。

▲漂洗液中乙醇的残留会抑制下游反应并降低洗脱效率，降低质粒产量。建议离心后再将吸附柱开盖晾干2-3 min，以彻底去除乙醇的残留。

将吸附柱HC放入一个新的收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加1-2 ml Buffer EB（Buffer EB提前在65℃预热可增加产量），室温放置2 min，10,000 rpm（~9,000×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，10,000 rpm（~9,000×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800 μl。