

版本号:240422

EndoFree Plasmid Midi Kit
无内毒素质粒中量快速提取试剂盒

目录号: PL22

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20次(PL2201)
RNase A (10 mg/ml)	4°C	500 µl
平衡液	室温	10 ml
溶液 P1	4°C	50 ml
溶液 P2	室温	50 ml
溶液 N3	室温	50 ml
内毒素清除剂	4°C	18 ml
去蛋白液 PE	室温	40 ml 第一次使用前按标签指示加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	25 ml 第一次使用前按标签指示加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
吸附柱 MC (5 ml)	室温	20 个
收集管 (15 ml)	室温	20 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

内毒素清除剂常温运输, 4°C 可以保存 12 个月。

储存事项:

1. RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输, 收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放 -20°C。
2. **第一次使用时, 可将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后置于 4°C 可保存 3 个月左右。**如果溶液 P1 中 RNase A 时间较久失活了, 提取的质粒可能有微量 RNA 残留, 在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

3. 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°C 水浴加热几分钟即可恢复澄清，重新混匀，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。

❖ 产品介绍：

采用优化的碱裂解法配合硅胶膜吸附技术特异性结合质粒，独特设计的溶液系统去除了杂质、蛋白和内毒素，配合公司独有的内毒素清除剂进一步将内毒素选择性清除到最低限度，除用于常规的 PCR，酶切，测序，转化等实验外，还可以直接用于原生质体转染和真核细胞转染等实验。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用特制吸附膜，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. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速、方便，从 30-70 ml 大肠杆菌 LB (Luria-Bertani) 培养液中，可快速提取 100-500 μg 纯净的高拷贝质粒 DNA。
3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低 ($<0.1 \text{ EU}/\mu\text{g DNA}$)，细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

❖ 注意事项

1. **所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成**，使用转速可以达到 8,000 $\times g$ (约 9,000 rpm)，带 15 ml 以上转头的台式离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、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 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、N3 的用量。
3. 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 $\mu\text{g}/\text{ml DNA}$ 。**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。**公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。**
4. **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。处于环状或超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。

❖ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和去蛋白液 PE 瓶中按标签指示加入无水乙醇，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 全部加入溶液 P1 中，混匀。每次使用后置于 2-8°C 保存。
1. 取 30-50 ml（最多不超过 75 ml）过夜培养的菌液加入 50 ml 离心管，8,000 ×g（约 9,000 rpm），离心 1 min，尽可能的倒干上清，收集菌体。
 - ▲ 如使用 15 ml 离心管，可以离心弃上清后，在同一个 15 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。
 2. 加 2.3 ml 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。
 - ▲ 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。
 3. 加 2.3 ml 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 min。
 - ▲ 温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时间不应超过 5 min！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
 4. 加 2.3 ml 溶液 N3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。8,000 ×g 离心 10 min，小心吸取上清至新管，避免吸取到漂浮的白色沉淀。
 - ▲ 加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
 - ▲ 如有漂浮白色沉淀，可用吸头撇开浮沫伸入液面下吸取，偶然吸到少量漂浮的白色沉淀也不影响实验结果，后续过滤漂洗过程中都会去除。
 5. 加入 0.1 体积(上清的体积的 10%，约 0.7ml)的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀。
 6. **柱平衡：**向吸附柱 MC 中加入 0.5 ml 平衡液，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，备用。
 - ▲ 平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。
 7. 向第 7 步得到的上清中加入 0.5 倍体积异丙醇（约 3.3 ml）后充分颠倒混匀后，分多次转移混合液至吸附柱 MC 中，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。
 - ▲ 个别情况下离心机转子倾角较大，建议每次加入吸附柱的溶液体积为 3.5 ml（不超过，以防产生漏液现象）。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
 8. 加入 3 ml 去蛋白液 PE（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），8,000 ×g 离心

1 min, 弃滤液。

9. 加入 3 ml 漂洗液 WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 8,000 ×g 离心 1 min, 弃滤液。再加入 3 ml 漂洗液 WB, 重复漂洗一次, 弃滤液。
10. 将空吸附柱放回收集管中, 8,000 ×g 离心 3 min 以干燥基质膜上残留乙醇。
 - ▲ 该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇, 残留乙醇抑制下游反应并降低洗脱效率, 降低质粒产量。
11. 将吸附柱置于新的 15 ml 离心管中, 室温晾干 2-3 min, 在吸附膜的中间部位加 0.5 ml (可在 0.3 ml-0.6 ml 变化) 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-75°C 水浴中预热可提高产量), 室温放置 3 min, 8,000 ×g 离心 1 min, 弃吸附柱。
 - ▲ 推荐: 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 1 min, 8,000 ×g 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%。
 - ▲ 洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量 (最小不应少于 0.3 ml)。

❖ 附录: 增强型内毒素清除步骤

⇒ 如果用户需要转染的是原代培养细胞等比较娇嫩脆弱的细胞系或者其它公司无内毒素提取后转染效果不佳的困难细胞系, 推荐加做以下增强型内毒素清除步骤, 以便进一步更彻底的清除内毒素, 达到最佳转染效果!

1. 接前面操作步骤 5, 将加入 0.1 体积内毒素清除剂混匀后的上清, 冰浴 (或放入冰箱冷冻室) 5 min 直到浑浊变清亮透明 (或仍旧稍有浑浊), 中间可以充分颠倒混匀 1 次。
 - ▲ 内毒素清除剂加入上清后, 可能会短暂浑浊, 但是冰浴后应恢复清亮 (或稍浑浊)。
2. 常温放置 3-5 min, 温度恢复室温溶液很快变为浑浊, 颠倒混匀。
 - ▲ 如室内温度较低或想加快速度可以在 37-42°C 水浴, 将很快变浑浊, 颠倒混匀。
3. 室温 8,000 ×g 离心 10 min 分相。上层水相含质粒 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。
4. 向第 3 步得到的上清中加入 0.5 倍体积异丙醇 (约 3.3 ml) 后充分颠倒混匀后接前面操作步骤 7 分多次转移混合液至吸附柱 MC 中, 完成后续操作步骤。