



EndoFree Plasmid Midi Kit

无内毒素质粒中提试剂盒 (5-15mL)

Cat. No. CW2105S

产品简介

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。本试剂盒在碱裂解法裂解细胞的基础上，采用独特的硅基质膜吸附技术，高效专一的结合质粒DNA；采用特殊的去内毒素buffer ER，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质。同时，配备特殊指示剂CWBlue，保证质粒提取高效完成。

每次可处理5-15mL菌液，所得质粒纯度高、提取量大，获得多至100μg转染级质粒DNA，同时也可用于DNA测序、PCR、体外转录、内切酶消化等实验。

储存条件：

室温 (15-30℃)。

产品内容

Component	CW2105S 50 preps
Buffer P1	30mL
Buffer P2	30mL
Buffer E3	30mL
Buffer PS	15mL
Buffer PW (concentrate)	10mL
Endo-free Buffer EB	10mL
RNase A (10 mg/mL)	600μL
Buffer ER	8mL
CWBlue	300μL
Spin Columns DL with Collection Tubes	50
Endo-Remover FM with Collection Tubes	50

自备试剂

无水乙醇、异丙醇。

注意事项

1. 加入RNase A的Buffer P1 置于2-8℃可稳定保存6个月。
2. 第一次使用前, 将RNase A溶液全部加入到Buffer P1中, 混匀, 置于2-8℃保存, 使用前需在室温中放置一段时间, 恢复至室温后使用。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer PW中加入无水乙醇。
4. 使用前请先检查Buffer P2、Buffer E3、Buffer ER是否出现结晶或沉淀, 如有结晶或沉淀现象, 可在37℃水浴几分钟, 即可恢复澄清(请勿剧烈晃动Buffer P2)。
5. 注意不要直接接触Buffer P2、Buffer E3和Buffer PS, 具有刺激性, 使用时请带手套, 使用后应立即盖紧盖子。
6. 使用Buffer PS处理过的吸附柱放置15-30分钟后再进行混合液过柱, 效果较好, 不建议放置超过30分钟使用。
7. 注意CWBlue 含有易挥发性物质, 使用后应立即盖紧盖子。
8. CWBlue的使用方法: CWBlue是一种指示剂。请按照CWBlue:溶液P1=1:100进行混合, 充分混匀。加入溶液P2至充分混匀后, 溶液呈现均一澄清的蓝色, 则表明菌体细胞裂解充分; 再加入溶液E3至充分混匀后, 溶液呈现无色透明, 且漂浮有白色絮状沉淀物, 表明中和复性反应已充分。

操作步骤 (快速版)

1. 取5-15mL过夜培养的菌液, 加入离心管(自备)中, 13,000rpm (~16,200×g) 离心1分钟收集细菌, 尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入500μL Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A) 以及5 μL CWBlue, 使用移液器或涡旋振荡器充分混匀, 悬浮细菌沉淀。

注意: 如果菌块未彻底混匀, 将会影响裂解效果, 使提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入500μL Buffer P2, 温和地上下颠倒混匀8-10次, 使菌体充分裂解, 室温放置5分钟。此时溶液应呈现均一澄清的蓝色粘稠状。

注意: 1) 温和混匀, 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片段。

2) 如果溶液未变得清亮, 提示可能菌量过大, 裂解不彻底, 应减少菌体量(此步骤不超过5分钟)。

3) 加入溶液P2至充分混匀后, 溶液呈现均一蓝色, 无明显白色絮状物, 则表明菌体细胞裂解充分。

4. 柱平衡: 向已装入收集管中的吸附柱 (Spin Columns DL) 中加入200μL Buffer PS, 13,000rpm离心2分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 柱平衡后建议静置15-30分钟待第7步使用 (建议不超过30分钟), 可提升吸附柱性能, 提高提取得率。

5. 向离心管中加入500 μ L Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8-10次, 至出现白色絮状沉淀, 室温放置5分钟。13,000rpm离心5分钟, 吸取上清, 将上清加入过滤柱 (Endo-Remover FM) 中 (已装入收集管), 13,000rpm离心1分钟过滤, 将收集管中的滤液转移到离心管 (自备) 中。

注意: 1) Buffer E3 加入后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。颠倒混匀次数可视情况增加至充分混匀, 此溶液呈现无色透明, 并漂浮有松散的豆花状白色沉淀物, 则说明中和充分。

2) 吸附柱的最大容积为750 μ L所以上清液请分两次过滤, 并混合于同一自备离心管中。

6. 加入0.3倍上清体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。
7. 将滤液与异丙醇的混合溶液转移到第4步平衡好的吸附柱 (已装入收集管) 中。
8. 13,000rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 吸附柱的最大容积为750 μ L, 所以第6步中所得溶液分多次过柱。

9. 向吸附柱中加入750 μ L Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 13,000rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液。
10. 将吸附柱重新放回收集管中, 13,000rpm离心1分钟。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等)。

11. 将吸附柱置于一个新的离心管 (自备) 中, 向吸附膜的中间部位加入100-200 μ L Buffer EB, 室温放置2-5分钟, 13,000rpm离心2分钟。-20 $^{\circ}$ C保存质粒。

注意: 1) 为了增加质粒的回收效率, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 室温放置2-5分钟, 13,000rpm离心2分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或>10 kb时, Buffer EB在65-70 $^{\circ}$ C水浴预热, 可以增加提取效率。

操作步骤 (内毒素去除加强版)

1. 取5-15mL过夜培养的菌液, 加入离心管 (自备) 中, 13,000rpm (~16,200 $\times$ g) 离心1分钟收集细菌, 尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入500 μ L Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A) 以及5 μ L CWBlue, 使用移液器或涡旋振荡器充分混匀, 悬浮细菌沉淀。

注意: 如果菌块未彻底混匀, 将会影响裂解效果, 使提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入500 μ L Buffer P2, 温和地上下颠倒混匀8-10次, 使菌体充分裂解, 室温放置5分钟。此时溶液应呈现均一澄清的蓝色粘稠状。

注意: 温和混匀, 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片段。如果溶液未变得清亮, 提示可能菌量过大, 裂解不彻底, 应减少菌体量 (此步骤不超过5分钟)。

4. 向离心管中加入500 μ L Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8-10次, 至出现白色絮状沉淀, 室温放置5分钟。13,000rpm离心5分钟, 吸取上清, 将上清加入过滤柱 (Endo-Remover FM) 中 (已装入收集管), 13,000rpm离心1分钟过滤, 将收集管中的滤液转移到离心管 (自备) 中。

注意: 1) 注意: Buffer E3加入后应立即颠倒混匀, 避免产生局部沉淀, 溶液呈现无色透明, 并漂浮有松散的豆花状白色沉淀物, 则说明中和充分。

2) 吸附柱的最大容积为750μL所以上清液请分两次过滤，并混合于同一自备离心管中。

5. 加入0.1倍滤液体积的Buffer ER，上下颠倒混匀，冰浴30分钟，再60℃水浴10分钟。
6. 柱平衡：向已装入收集管中的吸附柱（Spin Columns DL）中加入200μL Buffer PS，13,000rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 注意：**柱平衡后建议静置15-30分钟待第9步使用（建议不超过30分钟），可提升吸附柱性能，提高提取得率。
7. 第5步水浴完成后，8000rpm离心10分钟，此时管底出现黄色油相，将上清转移至干净离心管（自备）中，注意不要吸到底部黄色油相。
8. 加入0.3倍上清体积的异丙醇，上下颠倒混匀。
9. 将滤液与异丙醇的混合溶液转移到第6步平衡好的吸附柱（已装入收集管）中。
10. 13,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 注意：**吸附柱的最大容积为750μL，所以第8步中所得溶液分多次过柱。
11. 向吸附柱中加入750μL Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），13,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液。
12. 将吸附柱重新放回收集管中，13,000 rpm离心1分钟。
- 注意：**这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。
13. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附膜的中间部位加入100-200μL Buffer EB，室温放置2-5分钟，13,000rpm离心2分钟。-20℃保存质粒。
- 注意：**1) 为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，13,000rpm离心2分钟，将质粒溶液收集到离心管中。
- 2) 质粒拷贝数较低或>10 kb时，Buffer EB在65-70℃水浴预热，可以增加提取效率。

附不同类型质粒提取产量对照表

质粒DNA的产量和质量取决于许多因素，包括质粒拷贝数、插入片段大小、宿主菌株、培养体积、培养基和试剂盒的结合能力。每个质粒的拷贝类型不同，其相关拷贝数与预期产量也不同。5-15mL过夜培养菌液与预期产量如下表所示：

质粒	质粒类型	拷贝数	预期产量
pUC载体	高拷贝	500-700	15-70μg
pBluescript载体	高拷贝	300-500	15-70μg
pGM载体	高拷贝	300-400	15-70μg
pBR322载体	低拷贝	15-20	5-25μg
PACYC及其衍生载体	低拷贝	37540	5-25μg