



版本号：202412V01

EndoFree Plasmid Mini Kit

无内毒素质粒小提试剂盒

Cat.No. CW2106

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。本试剂盒提供一种简单、快捷、高效提取无内毒素质粒的新方法，提取的质粒最大限度去除内毒素，并能有效去除基因组DNA、RNA、蛋白等污染，操作简单方便。

本试剂盒适合提取1-5 mL菌液，在碱裂解法裂解细胞的基础上，通过新型硅基质膜高效专一的结合质粒DNA，每个吸附柱最高可吸附40 μ g的质粒DNA，同时采用特殊的缓冲液系统和除内毒素过滤柱，有效去除内毒素、蛋白等杂质。由本试剂盒所得质粒纯度高、质量稳定，特别适用于细胞转染，同时也可用于DNA测序，PCR，基于PCR的突变，体外转录，转化细菌，内切酶消化等下游实验。

保存条件

室温 (15-30°C)

产品内容

Component	CW2106S 50 preps
Buffer P1	15 mL
Buffer P2	15 mL
Buffer E3	15 mL
Buffer PS	15 mL
Buffer PW(concentrate)	10 mL
Endo-Free Buffer EB	10 mL
RNase A (10 mg/mL)	150 µL
Endo-Remover FM with Collection Tubes	50
Spin Columns DM with Collection Tubes	50

自备仪器、试剂

无水乙醇、异丙醇。

实验前准备及重要注意事项

- 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 和Buffer E3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。
- 5. 注意不要直接接触Buffer P2和Buffer E3, 使用后应立即盖紧盖子。
- 6. 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。

操作步骤

1. 取1-5 mL过夜培养的菌液, 加入离心管(自备)中, 13,000 rpm (~16,200×g) 离心30秒收集细菌, 尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入250 μ L Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A), 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250 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3-5分钟。此时溶液应变得清亮粘稠。
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。
4. 向离心管中加入250 μ L Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8-10次, 此时出现白色絮状沉淀, 室温放置5分钟。13,000 rpm离心5分钟, 吸取上清, 将上清加入过滤柱 (Endo-Remover FM) 中, 13,000 rpm离心1分钟过滤, 滤液收集在离心管(自备)中。
注意: Buffer E3 加入后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。
5. 加入0.3倍上清体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。
6. 柱平衡: 向已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中加入200 μ L Buffer PS, 13,000 rpm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。
7. 将步骤5中滤液与异丙醇的混合溶液转移到平衡好的吸附柱 (已装入收集管) 中。
8. 13,000 rpm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, 如果样品体积大于750 μ L可分批加入。
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), 13,000 rpm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, 13,000 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)。
11. 将吸附柱置于一个新的收集管中, 向吸附膜的中间部位加入50-100 μ L Endo-Free Buffer EB, 室温放置2-5分钟, 13,000 rpm离心2分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。-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, 13,000 rpm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, Endo-Free Buffer EB在65-70℃水浴预热, 可以增加提取效率。