



版本号: 202412V01

GoldVac EndoFree Plasmid Maxi Kit

金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒 (负压法)

Cat. No. CW2107

保存条件: 室温 (15-30°C)

产品内容

Component	CW2107S 2 preps	CW2107M 10 preps
Buffer P1	30 mL	125 mL
Buffer P2	30 mL	125 mL
Buffer E3	30 mL	125 mL
Buffer PS	15 mL	30 mL
Buffer PW (concentrate)	10 mL	50 mL
Endo-Free Buffer EB	10 mL	30 mL
RNase A (10 mg/mL)	600 μ L	2 mL
Buffer ER	8 mL	50 mL
CWBlue	300 μ L	3 mL
Endo-Remover FQ	2 sets	10 sets
DNA-Binding Tubes	2 sets	10 sets
VacConnectors	2 sets	10 sets
Centrifuge Tubes (50 mL)	2 sets	10 sets

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。本试剂盒提供一种快速、易大规模质粒制备的新方法。每次可处理100-300mL菌液, 获得多至2mg转染级质粒DNA。使用真空装置可同时纯化多个样本, 45分钟即可完成质粒提取, 有效减少手动操作时间。特殊的去内毒素Buffer ER, 可有效去除内毒素、蛋白质杂质等。同时配备特殊指示剂CWBlue, 保证质粒提取高效完成。

本试剂盒所得质粒纯度高、提取量大, 特别适用于细胞转染, 同时也可以用于DNA测序, PCR, 体外转录, 内切酶消化等实验。

自备试剂：无水乙醇、异丙醇、真空泵、废液收集装置、真空纯化装置。

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. Buffer P1在使用前先加入RNase A（将试剂盒中提供的RNase A全部加入），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和Buffer E3和Buffer PS，具有刺激性，使用时请戴手套，使用后应立即盖紧盖子。
6. 使用Buffer PS处理过的吸附柱放置15-30min后再进行混合液过柱，效果较好，不建议放置超过30 min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。
9. 请准备废液收集装置/缓冲瓶CWE100、真空纯化装置CWE200、真空泵CWE300、推荐使用康为世纪产品。



操作步骤（快速版）

1. 取100-300 mL过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，12,000×g离心2-3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12 mL Buffer P1（请先检查是否已加入RNase A）以及120 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12 mL 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。
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. 向离心管中加入12 mL Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8-10次, 至出现白色沉淀, 室温放置5分钟。
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。
5. 正确连接负压装置, 将连接管 (VacConnectors) 与DNA吸附柱 (DNA-Binding Tubes)连接好后插到负压装置的插口上。
注意: 确保连接管和吸附柱连接稳固, 防止漏气。
6. 柱平衡: 向DNA吸附柱 (DNA-Binding Tubes) 中加入2mL Buffer PS, 开启并调节负压至-300~-700mbar, 吸去柱上溶液, 待第9步备用。
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4步完成后, 12,000×g离心10分钟, 将上清全部倒入除内毒素过滤器 (Endo-RemoverFQ) 中, 尽量不要倒入大块沉淀, 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在干净的50mL离心管 (自备) 中。
8. 加入0.3倍上清体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。
9. 将上清与异丙醇的混合溶液转移到步骤6已经平衡好的吸附柱中, 吸去柱上溶液。
10. 向DNA吸附柱 (DNA-Binding Tubes) 中加入10 mL Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 吸去柱上溶液。
11. 重复步骤10。
12. 保持负压抽吸2-5分钟, 除去吸附膜内残留漂洗液, 干燥吸附膜。若一次抽吸六个样品以上, 可以将负压抽吸时间适当延长。待吸附膜彻底干燥后, 关闭负压开关。
注意: 1) 这一步的目的是将吸附柱中残留的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等)。
2) 根据吸附膜干燥情况, 决定负压装置抽吸时间。如未彻底晾干, 也可增加烘干步骤, 65℃烘干30min以彻底晾干吸附膜内残余的溶液。
13. 将压力恢复至0mbar时, 取下吸附柱, 将DNA吸附柱置于一个新的50 mL离心管 (Centrifuge Tubes) 中, 向吸附膜的中间部位加入1-3 mL Endo-Free Buffer EB, 室温放置2-5分钟, 12,000×g离心5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 (DNA-Binding Tubes) 中, 室温放置2-5分钟, 12,000×g离心5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。

操作步骤 (内毒素去除加强版)

1. 取100-300 mL过夜培养的菌液, 加入离心管 (自备) 中, 12,000×g离心2-3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12 mL Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A) 以及120 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12 mL 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。

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. 向离心管中加入12 mL Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8-10次, 至出现白色沉淀, 室温放置5分钟, 12,000×g离心10分钟, 将上清全部倒入除内毒素过滤器 (Endo-RemoverFQ) 中, 尽量不要倒入大块沉淀, 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在干净的50 mL离心管 (自备) 中

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。

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. 正确连接负压装置, 将连接管 (VacConnectors) 与DNA吸附柱 (DNA-Binding Tubes) 连接好后插到负压装置的插口上。

注意: 确保连接管和吸附柱连接稳固, 防止漏气。

7. 柱平衡: 向DNA吸附柱 (DNA-Binding Tubes) 中加入2mL Buffer PS, 开启并调节负压至-300~-700mbar, 吸去柱上溶液, 待第10步备用。

注意: 柱平衡后建议静置15-30分钟待第10步使用 (建议不超过30分钟), 可提升吸附柱性能, 提高提取率。

8. 第5步水浴完成后, 立即进行8000 rpm室温离心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。

9. 加入0.3倍上清体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。

10. 将上清与异丙醇的混合溶液转移到步骤7已经平衡好的吸附柱中, 吸去柱上溶液。

11. 向DNA吸附柱 (DNA-Binding Tubes) 中加入10 mL Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 吸去柱上溶液。

12. 重复步骤11。

13. 保持负压抽吸2-5分钟, 除去吸附膜内残留漂洗液, 干燥吸附膜。若一次抽吸六个样品以上, 可以将负压抽吸时间适当延长。待吸附膜彻底干燥后, 关闭负压开关。

注意: 1) 这一步的目的是将吸附柱中残留的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR等)。

2) 根据吸附膜干燥情况, 决定负压装置抽吸时间。如未彻底晾干, 也可增加烘干步骤, 65℃烘干30min以彻底晾干吸附膜内残余的溶液。

14. 将压力恢复至0 mbar时, 取下吸附柱, 将DNA吸附柱置于一个新的50 mL离心管 (Centrifuge Tubes) 中, 向吸附膜的中间部位加入1-3 mL Endo-Free Buffer EB, 室温放置2-5分钟, 12,000×g离心5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 (DNA-Binding Tubes) 中, 室温放置2-5分钟, 12,000×g离心5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。