



GoldHi EndoFree Plasmid Midi Kit

金牌超量无内毒素质粒中提试剂盒

Cat. No. CW2581

产品简介

本试剂盒专门用于从15-50 mL菌液中高效、快速提取质粒。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，每个吸附柱最高可吸附250 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器，有效去除内毒素、基因组DNA、RNA、蛋白等杂质。由本试剂盒所得质粒纯度高、质量稳定，可用于细胞转染，同时也可用于DNA测序，PCR，体外转录，内切酶消化等实验。

保存条件

室温(15-30°C)

产品内容

| Component | CW2581S 10 preps |
|---------------------------------------|---------------------|
| Buffer P1 | 30 mL |
| Buffer P2 | 30 mL |
| Buffer E3 | 30 mL |
| Buffer PS | 15 mL |
| Buffer PW (concentrate) | 10 mL |
| Endo-Free Buffer EB | 30 mL |
| RNase A (10 mg/mL) | 600 μ L |
| Endo-Remover FX | 10 |
| Plungers | 10 |
| Spin Columns DX with Collection Tubes | 10 |
| Centrifuge Tubes (15 mL) | 10 |

自备试剂

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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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先在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 $^{\circ}$ C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。
7. 使用Buffer PS处理过的吸附柱最好立即使用，避免放置时间过长影响使用效果。

操作步骤

1. 取15–50 mL过夜培养的新鲜菌液，加入离心管（自备）中，5000×g离心10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2.5 mL 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2.5 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2.5 mL Buffer E3，立即上下颠倒混匀8–10次，此时出现白色絮状沉淀。
注意：Buffer E3加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。
5. 安装过滤器（Endo-Remover FX）的滤帽，将步骤4所得溶液转移至过滤器中，待白色絮状沉淀浮于溶液上层，去掉过滤器的滤帽，对准干净的15 mL离心管（自备），慢慢推动推柄（Plungers）过滤，使溶液尽可能多的通过，将滤液收集在离心管中。
6. 向滤液中加入1/3溶液体积的异丙醇，上下颠倒混匀。
7. 柱平衡：向已装入15 mL离心管的吸附柱（Spin Columns DX）中加入1 mL Buffer PS，2500×g离心2分钟，倒掉离心管中的废液，将吸附柱重新放回离心管中。
8. 将步骤6中滤液与异丙醇的混合溶液转移至已平衡的吸附柱（已装入收集管）中。
9. 2500×g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4 mL，所以第8步中所得溶液分2次过柱。
10. 向吸附柱中加入2 mL Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），2500×g离心1分钟，倒掉收集管中的废液。
11. 重复步骤10。
12. 将吸附柱重新放回收集管中，2500×g离心2分钟，倒掉废液，将吸附柱置于室温干燥5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15 mL离心管中，向吸附膜的中间部位加入0.5–1 mL Endo-Free Buffer EB，室温放置2–5分钟，2500×g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，2500×g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。**