

版本号: DP240417

# EndoFree Mini Plasmid Kit

## 无内毒素质粒小提试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP123

### 产品内容

产品组成	DP123-02 (50 preps)	DP123-03 (200 preps)
溶液P1 (Buffer P1)	15 ml	60 ml
溶液P2 (Buffer P2)	15 ml	60 ml
溶液P4 (Buffer P4)	15 ml	60 ml
去内毒素溶液ER (Endotoxin Removal Buffer ER)	5 ml	20 ml
缓冲液ED (Buffer ED)	35 ml	140 ml
漂洗液PW (Buffer PW)	15 ml	2 × 30 ml
洗脱缓冲液TB (Buffer TB)	15 ml	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	150 µl	600 µl
吸附柱CP4 (Spin Columns CP4)	50个	200个
收集管(2 ml) (Collection Tubes 2 ml)	50个	200个
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml))	50个	200个

### 储存条件

该试剂盒置于室温 (15-30°C) 干燥条件下, 可保存15个月。若溶液产生沉淀, 使用前可在37°C水浴中预热10 min以溶解沉淀, 不影响效果。第一次使用前将RNase A加入溶液P1中, 混匀后置于2-8°C保存, 可稳定保存6个月。单独包装的RNase A 在室温可稳定保存15个月。

## 产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒DNA。同时采用特殊的溶液ER，可有效的去除内毒素；整个提取过程仅需1个小时，方便快捷。以下操作步骤适用于提取1-5 ml过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件、细胞的裂解、质粒拷贝数、质粒的稳定性、抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒DNA可适用于转染多种细胞及各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

## 提取得率

质粒类型	菌液量	得率	质粒
低拷贝	1-5 ml	3-12 $\mu\text{g}$	pBR322, pACYC及其衍生载体 pSC101及其衍生载体, SuperCos, pWE15
高拷贝	1-5 ml	6-30 $\mu\text{g}$	pTZ, pUC, pBS, pGM-T

## 注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液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°C保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液PW中加入无水乙醇。
3. 使用前先检查溶液P2和P4是否出现浑浊，如有混浊现象，可在37°C水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
4. 注意不要直接接触溶液P2和P4，使用后应立即盖紧盖子。
5. 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心，速度为12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)。
6. 提取的质粒量与细菌培养浓度、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10 kb的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加P1、P2、P4的用量，洗脱缓冲液应在65-70°C预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。

---

## 操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取1–5 ml过夜培养的菌液加入离心管中，12,000 rpm (~13,400×g) 离心1 min，尽量吸除上清。

**注意：**菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌体量以能够充分裂解为佳，过多的菌体裂解不充分会降低质粒的提取效率。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入150 μl溶液P1 (**请先检查是否已加入RNase A**)，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

**注意：**请务必彻底悬浮细菌沉淀，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. 向离心管中加入150 μl溶液P2，温和地上下翻转6–8次使菌体充分裂解。

**注意：**温和地混合，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过5 min，以免质粒受到破坏。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 向离心管中加入150 μl溶液P4，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，12,000 rpm (~13,400×g) 离心7 min，此时在离心管底部形成沉淀。

**注意：**P4加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

5. 向滤液中加入60 μl去内毒素溶液ER，上下颠倒混匀后溶液呈现出均匀透明的黄色。

6. 向混合溶液中加入0.3倍体积的异丙醇 (**加入异丙醇过多容易导致RNA污染**)，上下颠倒混匀后转移到吸附柱CP4中 (**吸附柱放入收集管中**)。

**注意：**过滤后滤液会损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱CP4的最大容积为700 μl，所以需要分次过柱。

7. 室温12,000 rpm (~13,400×g) 离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

**注意：**将第7步中所得溶液分次过柱，每次均按以上条件操作。

---



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

8. 向吸附柱CP4中加入600  $\mu$ l缓冲液ED，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP4放入收集管中。

9. 向吸附柱CP4中加入700  $\mu$ l漂洗液PW (**请先检查是否已加入无水乙醇**)，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP4放入收集管中。

**注意：加入漂洗液PW后，如果室温静置2-5 min，有助于更好地去除杂质。**

10. 向吸附柱CP4中加入700  $\mu$ l漂洗液PW，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心1 min，倒掉收集管中的废液。

11. 将吸附柱CP4重新放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

**注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱CP4开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。**

12. 将吸附柱CP4置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加50–100  $\mu$ l洗脱缓冲液TB，室温放置2 min，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心1 min将质粒溶液收集到离心管中。

**注意：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，重复步骤12。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液，应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。洗脱缓冲液体积不应少于50  $\mu$ l，体积过小影响回收效率。且DNA产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防DNA降解。**

## 质粒DNA浓度及纯度检测

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。电泳可能为单一条带，也可能为2到3条DNA条带，这主要与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。OD<sub>260</sub>值为1相当于大约50  $\mu$ g/ml 双链DNA。

OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值应为1.7–1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，但并不表示纯度低，因为pH值和离子存在会影响光吸收值。