

EndoFree Plasmid Maxi Kit

REF: EG24701S

储运条件

RNase A：-20~-30°C保存，常温运输；

其他组分：15~30°C保存，常温运输。

产品组成

组分	规格 (10 rxns)
RNaseA (10 mg/ml)	1.1 ml
Buffer BL	30 ml
Buffer P1	110 ml
Buffer P2	110 ml
Buffer P4	110 ml
Endotoxin Removal Buffer	32 ml
Buffer W1	75 ml
Elution Buffer	25 ml
Adsorption columns EC (with Collection Tubes)	10 个
Collection Tubes	10 个

产品简介

本试剂盒采用改良的碱裂解处理方法及硅胶膜吸附技术，可特异、高效地获得无内毒素高纯度质粒 DNA；独特的内毒素去除技术，无需过滤，操作简便。所得质粒可直接用于细胞转染、酶切、连接、转化、PCR、测序等分子生物学实验。高拷贝质粒，100 ml 菌液通常可获得 500~1500 µg 质粒，低拷贝质粒，200 ml 菌液通常可获得 200~600 µg 质粒。

产品特点

高纯度：采用独特的内毒素去除技术，特异的去除内毒素

高效转染：适合包括内毒素敏感细胞在内的绝大多数细胞的转染

操作简便：采用吸附柱技术特异吸附质粒，无需过滤，操作更为简便

应用广泛：动植物细胞转染、分子生物学实验均可应用

适用范围

本品适用于从 100 ml~200 ml 细菌培养物中提取多至 1500 µg 的高纯度无内毒素的质粒 DNA。

注意事项

1. 细菌培养时间一般为 12~16 h，如接种量大则应减少培养时间，过度培养会降低质粒质量甚至导致突变。
2. 每次使用时需观察 Buffer P2 和 Buffer P4 是否形成沉淀，如有沉淀于 37°C 溶解后使用。
3. 用平衡液处理过的柱子建议立即使用，放置时间过长影响使用效果。
4. 第一次使用前，按照瓶上标签向 Buffer W1 中加入 175 ml 无水乙醇。
5. Buffer P1 加入 RNase A 后置于 2~8°C 保存。
6. 各溶液使用后请立即盖紧盖子。
7. 所有操作均在室温下进行。
8. 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、质粒的稳定性等因素有关。

使用方法

自备：无水乙醇、异丙醇、50 ml 离心管。

1. 柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 2.5 ml 的平衡液 Buffer BL（当天处理），10,000 rpm 离心 2 min，弃去收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。
2. 取 100~200 ml（对于高拷贝质粒，建议 100 ml 菌液；对于低拷贝质粒，建议 200 ml 菌液，最高不超过 300 ml 菌液）过夜培养的菌液，10,000 rpm 离心 2 min，弃上清。
3. 加入 10 ml Buffer P1（使用前将试剂盒提供的 RNase A 全部加入），漩涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀。
4. 加入 10 ml Buffer P2，温和颠倒混匀使菌体完全裂解。

注：不可剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 的污染；所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，可增加 Buffer P2 的用量，在后续的操作中按倍数增加 Buffer P4 的用量。

5. 加入 10 ml Buffer P4，立即温和颠倒混匀，至溶液出现白色絮状物。10,000 rpm 离心 10 min，使白色沉淀离至管底（可适当增加离心时间），小心将上清转移至干净离心管（自备）中（不要带入沉淀）。

注：

- (1) Buffer P4 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀；
- (2) 离心后在最上层可能会形成一层致密的漂浮膜，注意不要倒入吸附柱。

6. 加入 3 ml Endotoxin Removal Buffer，颠倒混匀。

注：Endotoxin Removal Buffer 可能会出现分层，不影响使用，使用前摇匀即可。

7. 加入 0.3 倍上述上清液体积的异丙醇，颠倒混匀（加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染）。

8. 将步骤 7 所得混合溶液转移到平衡好的吸附柱 EC (with Collection Tubes) 中, 10,000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中的滤液 (吸附柱最大容积为 15 ml, 即上步中所得溶液需分 2~3 次过柱)。

注: 如果离心机转子倾角较大时, 建议加入吸附柱的溶液体积不超 10 ml, 以防漏液。

9. 加入 10 ml Buffer W1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 10,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

10. 重复步骤 9。

11. 将吸附柱 EC 放回空收集管中, 10,000 rpm 离心 5 min。

12. 将吸附柱 EC 置于新的 50 ml 离心管中, 开盖放置 5 min, 彻底挥发乙醇。

13. 在吸附膜的中间部位加入 1~2 ml 洗脱液 Elution Buffer (60~65°C 预热效果更好), 常温放置 2 min, 10,000 rpm 离心 2 min, 即得质粒 DNA (如需较多量 DNA, 可将得到的溶液重新转入吸附柱, 重复此步骤)。

常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
质粒 DNA 产量低	质粒拷贝数低、质粒 >10 kb 或革兰氏阳性菌质粒	应加大菌体使用量, 可使用 300~500 ml 过夜培养物, 洗脱液 Elution Buffer 60°C 水浴预热, 吸附和洗脱时间可以适当延长, 以增加提取效率
	菌种问题	菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 培养细菌前建议先划线活化, 以稳定产量
	细菌未充分裂解	细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬或菌体不宜过多, 避免成团或过量的细菌无法裂解降低产量
质粒 DNA 中有基因组 DNA 污染	菌液培养时间太长	菌液培养时间需控制在 12~16 h
	裂解问题	加入 Buffer P2 时, 必须轻柔颠倒混匀; 处理多个样品时, 从加入 Buffer P2 时算起, 总时间不要超过 5 min