



EndoFree Plasmid Midi Kit

无内毒素质粒中提试剂盒

目录号：CW2105S (50 preps)

保存条件：室温 (15-30℃)

产品内容

Component	CW2105S
	50 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	10 ml
RNase A (10 mg/ml)	600 µl
Endo-Remover FM with Collection Tubes	50
Spin Columns DL with Collection Tubes	50

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。

本试剂盒适合提取5-15ml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100 µg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。

自备试剂：无水乙醇、异丙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 所有组分可在干燥、室温（15-30℃）环境稳定保存1年，更长时间保存可置于2-8℃，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5-15 ml过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，13,000 rpm（~16,200×g）离心1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**500 μl 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**500 μl 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**500 μl 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（已装入收集管），13,000 rpm离心1分钟过滤，将收集管中的滤液转移到离心管（自备）中。
注意：1）Buffer E3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。
2）吸附柱的最大容积为750 μl，所以上清液请分两次过滤，并混合于同一自备离心管中。
5. 向滤液中加入**450 μl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 DL）中加入**200 μl Buffer PS**，13,000 rpm离心2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 μl，所以第5步中所得溶液分多次过柱。
9. 向吸附柱中加入**750 μl 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离心管（自备）中，向吸附膜的中间部位加入**100-200 μ l Endo-Free Buffer EB**，室温放置2-5分钟，13,000rpm离心2分钟。-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。Endo-Free Buffer EB在65-70℃水浴预热，适当延长吸附和洗脱的时间，可以增加提取效率。

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。