

# EndoFree Midi Plasmid Kit

## 无内毒素快速质粒中量提取试剂盒

(离心柱型)

产品编号: MA0476 规格: 1T/10T

### 产品内容

产品组成	MA0476-T (1 preps)	MA0476 (10 preps)
Buffer BGL	2ml	15ml
Buffer A1	4 ml	30 ml
Buffer B1	4 ml	30 ml
Buffer C1	2 ml	15 ml
Buffer D1	8 ml	70 ml
Buffer PW	3 ml	24 ml
Buffer EB	2 ml	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	40 µl	300 µl
吸附柱	1 个	10 个
收集管 (50ml)	2 个	20 个
说明书	1 份	1 份

### 保存方法

1. 本试剂盒于常温运输, 室温干燥条件下, 可保存12个月, 更长时间的保存可置于2-8°C。
2. 温度较低时, 有的溶液可能产生沉淀, 使用前在37°C水浴中加热, 直至沉淀消失。
3. 第一次使用前将RNase A加入Buffer A1中, 混匀后置于2-8°C保存, 有效期为半年。
4. RNase A在室温可稳定保存6个月以上, 长期保存需存放于-20°C。

### 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。同时采用去内毒素溶液D1, 可有效的去除内毒素、蛋白等杂质; 整个提取过程仅需1h, 方便快捷。使用本试剂盒提取的质粒DNA可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

推荐每次菌液使用量: 高拷贝质粒推荐使用量为50 ml, 得率一般在250-750 µg左右; 低拷贝质粒推荐使用量为100 ml, 得率一般在50-300 µg左右。

## 操作步骤

使用前请先在Buffer PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱中加入1ml的Buffer BGL，室温放置2分钟，室温5000×g离心10分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（用平衡液处理过的柱子需半小时内使用）。
2. 取20-50 ml(根据培养菌体的浓度选择合适的量,低拷贝推荐用100ml)过夜培养的菌液，加入离心管中，室温5000×g离心10分钟，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌液量以能够充分裂解为佳，菌液过多会导致裂解不充分从而降低质粒的提取效率）。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入2.5ml Buffer A1（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沉淀。

**注意：一定要彻底悬浮菌体，否则会影响裂解，导致得率和纯度偏低。对于低拷贝的质粒，加大菌体用量的同时按比例增加Buffer A1、B1、C1的用量。**

4. 向离心管中加入2.5ml Buffer B1，立即温和颠倒离心管6-8次，使菌体充分裂解，室温放置5分钟。  
**注意：温和混合，不可剧烈震荡，以免打断基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，以免质粒受到破坏。如果菌液未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。**

5. 加入1.25 ml Buffer C1，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。然后室温放置10分钟左右，将离心管转至高速离心机10000×g离心10分钟，使白色沉淀离心至管底（可适当增加离心时间），上清收集在干净的50 ml的管中（自备）。

**注意：加入溶液C1后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果离心后溶液还有白色沉淀，可再次离心。如果菌体过多（>50 ml），推荐延长离心时间至20-30分钟。**

6. 转移上清至新的50ml离心管中(若上清仍有白色沉淀,可再次离心),加入等体积的Buffer D1及等体积的无水乙醇,用手用力的甩5次以混匀,溶液需马上离心过DNA柱。
7. 立即转移上述混合液到吸附柱中(吸附柱放入50ml收集管中),室温5000×g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。
8. 向吸附柱中加入5 ml Buffer PW(请先检查是否已加入无水乙醇),室温5000×g离心1分钟,弃掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。
9. 重复操作步骤8一次。

10. 向吸附柱中加入5 ml无水乙醇，室温 $5000\times g$ 离心1分钟，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

11. 将离心管放回高速离心机中，室温 $5000\times g$ 离心10分钟，然后将吸附柱开盖，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。

**注意：乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR等)实验。**

12. 将吸附柱置于一个干净的50 ml收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加0.5-1 ml洗脱缓冲液EB，室温放置5分钟，然后室温 $>5000\times g$ 离心5分钟，将50 ml离心管中的洗脱液全部移入一个干净的1.5 ml离心管， $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

**注意：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，重复步骤12。**

**洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用ddH<sub>2</sub>O做洗脱液应保证其pH值在7.5-8.0范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量的多少主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定。洗脱缓冲液体积不少于0.5 ml，体积过小影响回收效率。DNA产物应保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ ，以防DNA降解。**

**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 A1 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存。

2. 使用前先检查溶液 B1 和 D1 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在 $37^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。

3. 注意不要直接接触溶液 B1 和 D1，使用后应立即盖紧盖子。

4. 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，同时按比例增加溶液 A1、B1、C1 的用量；洗脱缓冲液 EB 推荐在 $65-70^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热。可以适当延长吸附和洗脱时间，以提高提取效率。

### 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。OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50  $\mu\text{g/ml}$  双链 DNA。纯化的质粒 DNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 通常在 1.8-2.0 左右，可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的实验中。