北京博凌科为生物科技有限公司
Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.
Tel:010-57158602/52872342/80773165（Fax）
Http://www.blkwbio.com/
E-mail:blkwbio@blkwbio.com

- 无内毒素高纯质粒大提试剂盒
- 目录号 **1213**
- 使用手册
- 实验室使用，仅用于体外

无内毒素高纯质粒大提试剂盒

EndoFree Plasmid Maxi Kit

目录号：1213

目录编号	包装单位
121301	**10次**

❖ **适用范围：**

适用于大规模质粒制备（max preparations）

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性：**

试剂盒组成	保存	10 次(121301)
RNaseA（10mg/ml）	**-20℃**	**750μl**
溶液 P1	**4℃**	**77 ml**
溶液 P2	**室温**	**77 ml**
溶液 N3	**室温**	**77 ml**
内毒素清除剂	**-20℃**	**50 ml**
漂洗液 WB	**室温**	**25 ml X 2** **第一次使用前按说明加指定量乙醇**
洗脱缓冲液 EB	**室温**	**20 ml**
吸附柱 DC	**室温**	**10 个**
收集管（50ml）	**室温**	**10 个**

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

内毒素清除剂常温运输，4 度可以保存一个月，长期保存放-20℃。

储存事项:

1. **第一次使用时，将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后（终浓度 100ug/ml）置于 4℃保存。**如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。

2. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。

3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应**及时盖紧盖子**。

❖ **产品介绍：**

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，粗提物通过独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素，然后离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过漂洗液将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ **产品特点：**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。

2. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。快速， 方便，从 150-300 ml 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 0.2-1.5mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90 %。

3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低（<10 EU/μg DNA），细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

❖ **注意事项**

1. **所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，**使用转速可以达到12,000 x g，带50ml转头的台式离心机。

2. 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10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加P1、P2、N3 的用量，洗脱缓冲液应在70℃预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。

3. 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。OD260值为1相当于大约50μg/ml DNA。**电泳可能为单一条带，也可能为2条或者多条DNA条带，**这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。**本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过90%。**

4. **质粒DNA确切分子大小， 必须酶切线性化后，**对比DNA分子量Marker才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。

5. **洗脱液EB不含有螯合剂EDTA，**不影响下游酶切、连接等反应。**也可以使用水洗脱，但应该确保pH大于7.5，**pH过低影响洗脱效率。用水洗脱，质粒应该保存在－20℃。质粒DNA如果需要长期保存，可以用TE缓冲液洗脱（10mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH 8.0），但是EDTA可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

提示：

⇨ 第一次使用前请先在 2 瓶漂洗液 WB 瓶中分别加入 100 ml 无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入!

⇨ 将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8℃保存。

1. 取 150-200 ml (最多不超过 300 ml)过夜培养的菌液，12,000xg（约 10,000rpm），离心 1-2 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。

   收集超过 50 毫升菌液，可以离心弃上清后，在同一个 50ml 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

2. 用 7.5 ml 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。

   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. 加 7.5 ml 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 分钟。

   温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

4. 加 7.5 ml 溶液 N3，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 x g 离心 10-15 分钟，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮白色沉淀。

   加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

5. 加入 0.1 体积(上清的体积的 10%，约 2.4ml)的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀，冰浴或者插入碎冰中(或冰箱冷冻室)放置 5 分钟直到浑浊变清亮透明（或仍旧稍有浑浊），中间偶尔混匀几次。

   内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮（或稍浑浊）。

6. 常温放置 3-5 分钟，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。

   如室内温度较低或者想加快速度可以在 37−42℃水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。

7. 室温 14,000 x g 离心 10 分钟分相 。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管（注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质），弃油状层。

8. 向上层水相中**加入 0.5 体积异丙醇（约 11ml）后充分颠倒混匀**后分多次（每次不超过 15ml）转入吸附柱 DC 中（吸附柱放入收集管中），12,000 x g 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。

9. 加入 10ml 漂洗液 WB（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 x g 离心 1 分钟，弃掉废液。再加入 10ml 漂洗液 WB，重复漂洗一次。

10. 将吸附柱 DC 放回空收集管中，最高速（最好大于 12,000 x g）离心 3 分钟以干燥基质膜上残留乙醇，用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，打开盖子室温晾干 3-5 分钟。

    该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。

11. 取出吸附柱 DC，放入一个干净的离心管中，**在吸附膜的中间部位**加 1-2ml 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70℃水浴中预热可提高产量），室温放置 3 分钟，12,000 x g 离心 3 分钟。

    推荐：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，室温放置 3 分钟，12,000 x g 离心 3 分钟。洗脱两遍可提高浓度约 10%。

    洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量（最小不应少于 1ml）。

❖ 问题与解决方法

问题	评论与建议
质粒 DNA 产量低	*忘加抗生素，非质粒转化细胞过度生长-**建议：**确保固体、液体培养基中都加入了适当的抗生素。 *细菌培养时间太长，老化细菌开始裂解-**建议：**接种过夜培养的新鲜单菌落于加了合适抗生素的培养基中培养 12-16 个小时。 *使用了低拷贝数质粒-**建议：**建议使用高拷贝数质粒，低拷贝数质粒应该适当加大处理体积。 *细菌培养时间过短，菌液内细菌浓度过低-**建议：**细菌培养到[A_{600}]吸光值为 2-4 的时候收集菌体。 *细菌细胞裂解不完全-**建议：**使用建议的菌体处理量，不要过量；涡旋或者吹打，确保菌体充分重悬于溶液 P1 中，不应该见到未散开的细菌团块；加入裂解液 P2 裂解后，应该是粘稠和透明的。 *质粒 DNA 产量使用分光光度计定量不准确-**建议：**分光光度计定量常常偏高，使用琼脂糖电泳/EB 染色定量。 *洗脱效率不高-**建议：请阅读实验步骤 15 和注意事项 6**。
未提取到质粒 DNA	*漂洗液 WB 中忘记加无水乙醇-**建议：第一次实验时，在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇** *质粒洗脱液含有较多乙醇，琼脂糖电泳/EB 染色定量时质粒 DNA 漂出上样孔-**建议：**确保已经做了步骤 14，将离心吸附柱的乙醇残留去除；或者适当提高上样缓冲液浓度。。
质粒 DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	*忘记做步骤 14，乙醇抑制了酶切反应-**建议：**做步骤 14，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。加做步骤 15。 *一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应-**建议：**将洗脱的回收 DNA 溶液 13,000rpm 再离心 1 分钟，小心取上清使用，

基因组 DNA 污染	*裂解时基因组被剪切打断了-**建议：**做步骤 3 时轻柔的通过颠倒混匀，**不要涡旋或者剧烈震荡。**
质粒 DNA 上缺口或者电泳上超螺旋带前出现变性质粒带	*步骤 3 裂解时间过长-**建议：裂解时间不要超过 5 分钟。**
产物中含有 RNA 污染	*第一次做实验时候，忘记将 RNase A 加入 P1 溶液，RNase A 失活或者起始处理量过量-**建议：**第一次实验前确保将 RNase A 加入了溶液 P1； P1 溶液超过 3 个月的，可加入一些新 RNase A 在溶液 P1；处理量不要过量；菌体重悬于 P1 溶液后可放置几分钟让 RNase A 充分起作用后再进行下一步。