

Imagene®

EndoFree HiPure Plasmid Mini Kit 无内毒素高纯质粒小量快速提取试剂盒



CODONX

RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

EndoFree HiPure Plasmid Mini Kit

无内毒素高纯质粒小量快速提取试剂盒

目录号: PE103

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (PE103-01)
平衡液 BS	室温	5ml
RNaseA (10mg/ml)	-20℃	150µl
溶液 A	4℃	15 ml
溶液 B	室温	15 ml
溶液 D	室温	15 ml
内毒素清除剂 ER	-20℃	5ml
漂洗液 WB	室温	15 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml
吸附柱 AD	室温	50 个
收集管 CT (2ml)	室温	50 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 ER 常温运输, 4 度可以保存一个月, 长期保存放-20℃。

储存事项:

- 第一次使用时, 将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 A 后 (终浓度 100ug/ml) 置于 2-8℃ 保存。如果溶液 A 中 RNase A 失活, 提取的质粒可能会有微量 RNA 残留, 在溶液 A 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 B 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀, 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。
- 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，通过独特的内毒素清除剂 ER 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，再通过去蛋白液和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。
2. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低 (<0.1 EU/ μ g 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. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机。
2. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒，建议**接种单菌落于1.5-4.5 ml加合适抗生素的LB培养基，过夜培养14-16个小时**，可提取出多达20 μ g的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10kb的大质粒，应适当加大菌体使用量，使用5-10 ml过夜培养物，同时按比例增加A、B、D的用量，其它步骤相同。
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50 μ g/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。**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。

❖ 关于平衡液 BS 的使用

1. **介绍:** 核酸吸附硅胶膜柱子长期放置过程中会同空气中的电荷/尘埃发生反应而影响其核酸的结合能力。硅胶柱经平衡液 BS 预处理后可大大减少柱子中硅胶膜的憎水基团, 提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液 BS 是强碱性溶液, 若不小心碰到, 请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖, 以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成, 请加热至 37°C 使沉淀完全消失。
2. **使用方法:** 取一个新的硅胶膜吸附柱装在收集管 CT 中, 吸取 100 μ l 的平衡液 BS 至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管 CT 中废液, 将吸附柱子重新放回收集管 CT。此时平衡液 BS 预处理柱子完毕。接后续的操作步骤。

❖ 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漂洗液 WB 瓶中加入指定量无水乙醇, 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 A 中, 混匀, 每次使用后置于 2-8°C 保存。
1. 取 1.5-4.5 ml 过夜培养的菌液, 12,000rpm 离心 30 秒, 尽可能的倒干上清, 收集菌体。
收集超过 1.5 ml 菌液, 可以离心弃上清后, 在同一个 1.5ml 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 250 μ l 溶液 A 重悬菌体沉淀, 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 250 μ l 的溶液 B, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解, 室温放置 4 分钟。
温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免基因组 DNA 剪切断裂! 所用时间不应超过 5 分钟! 以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠, 如果菌体少, 很快清亮粘稠后就可以做下一步, 不是一定要准确的 5 分钟。
 4. 加 250 μ l 溶液 D, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀时会出现白色絮状沉淀。13,000rpm 离心 10 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 D 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 80 μ l)的内毒素清除剂 ER 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 ER 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 $^{\circ}$ C 水浴, 将很快变浑浊, 颠倒混匀。

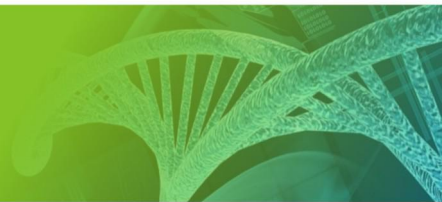
7. 室温 14,000 x g 离心 10 分钟分相。上层水相含 DNA, 下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管(注意不要吸到蓝色油状层, 里面含内毒素等杂质), 弃油状层。

平衡液 BS 预处理吸附柱:

使用平衡液 BS 预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤, 具体方法参见前文“关于平衡液 BS 的使用”

8. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇(约 370 μ l)后充分颠倒混匀后分两次(每次不超过 700 μ l)转入吸附柱 AD 中(吸附柱 AD 放入收集管 CT 中), 12,000 x g 离心 1 分钟, 倒掉收集管 CT 中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
9. 加入 600 μ l 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。再加入 600 μ l 漂洗液 WB, 重复漂洗一次。
10. 将吸附柱 AD 放回空收集管 CT 中, 13,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱 AD, 放入一个干净的离心管中, **在吸附膜的中间部位**加 50-100 μ l 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 离心 1 分钟。

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, 但是最小体积不应少于 30 μ l, 体积过小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com