EndoFree Midi Plasmid Kit

无内毒素质粒中量提取试剂盒

版本号：V1.0-202206

一、产品规格

组分编号	产品组成	BLGE054 (10 T)
BLGE299-30ML	平衡液 BL (Buffer BL)	30 mL
BLGE300-30ML	溶液 P1 (Buffer P1)	30 mL
BLGE301-30ML	溶液 P2 (Buffer P2)	30 mL
BLGE312-15ML	溶液 E3 (Buffer E3)	15 mL
BLGE313-70ML	溶液 EBT (Buffer EBT)	70 mL
BLGE316-30ML	漂洗液 GDE (Buffer GDE)	30 mL
BLGE314-36ML	漂洗液 MRDE (Buffer MRDE)	36 mL
BLGE315-16ML	漂洗液 PWF (Buffer PWF)	16 mL
BLGE304-15ML	洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 mL
BLGE305-150UL	RNA 酶 A (100 mg/mL RNase A)	150 μL
BLGE306-10pcs	过滤器 CS1 (Filtration CS1)	10 个
BLGE307-10pcs	吸附柱 CP7 (Spin Columns CP7)	10 个
BLGE308-20pcs	15 mL 收集管 (15 mL Collection Tubes)	20 个

二、产品情况

本试剂盒采用了可高效专一结合质粒 DNA 的硅胶膜吸附技术,同时采用 EBT 溶液和过滤器 CS1，可有效的去除内毒素、蛋白质等杂质。

推荐过夜培养的大肠杆菌菌液使用量为:高拷贝质粒为 50 mL 每次,得率一般在 250 - 750 μg 左右；低拷贝质粒为 100 mL 每次，得率一般在 100 - 300 μg 左右。质粒的提取得率和质量与宿主菌的种类、培养条件、菌体裂解、质粒拷贝数、质粒稳定性、抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染细胞等多种实验。整个提取过程仅需 1h，方便快捷。

三、储存运输

常温运输；

试剂盒在 15 - 25℃干燥室温条件下，可保存 12 个月；

试剂盒在 2 - 8℃条件下可保存更长时间，若溶液产生沉淀，应在使用前于 37℃溶解沉淀；

单独包装的 RNaseA 在室温可稳定保存 12 个月以上；

加入 RNaseA 的溶液 P1 在 2 - 8℃条件下可稳定保存 6 个月。

四、注意事项

在使用本试剂盒之前请务必阅读此注意事项！

（一）溶液 P1 在使用前先加入全部的 RNase A 并混匀，放入 2 - 8℃保存。

（二）第一次使用前应按照瓶签说明，先在漂洗液 PWF 和 MRDE 中加入无水乙醇。

（三）使用前先检查平衡液 BL、溶液 P2、溶液 E3 和溶液 EBT 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，可在 37℃水浴中加热几分钟以使其恢复澄清。

（四）实验前使用平衡液 BL 处理吸附柱，可以最大限度激活硅基质膜，提高得率。但用平衡液处理过的柱子最好立即使用，放置时间过长会影响使用效果。

（五）注意皮肤不能直接接触溶液 P2、E3 和 EBT，使用后应立即盖紧瓶盖。

（六）使用过滤器时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出，避免滤膜因压力而松动。

（七）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 P1、P2、E3 、EBT 的用量；洗脱缓冲液推荐在 65 - 70℃水浴中预热，可以适当延长吸附和洗脱时间，以提高质粒得率。

五、实验流程

注意：

第一次使用前应按照瓶签的说明先在溶液 P1 中加入全部的 RNase A；

第一次使用前应按照瓶签的说明先在漂洗液 PWF 和 MRDE 中加入无水乙醇。

（一）步骤 1

加 2 mL 的平衡液 BL 至吸附柱 CP7 中 (**吸附柱放入 15 mL 收集管中**)，5,000 rpm(~4,500 xg)离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

注意：用平衡液处理过的柱子最好立即使用，放置时间过长会影响使用效果。

（二）步骤 2

取 20 - 50 mL (**根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝可用 100 mL**) 过夜培养的菌液加入离心管，室温 5,000 rpm(~4,500 xg)离心 3 min 收集细菌，尽量吸除上清。

注意：

（1）可以通过多次离心的方法将较多菌液的菌体沉淀收集到一个离心管中，菌体量以保证充分裂解为宜，避免过多的菌体导致的裂解不充分，从而降低质粒的提取效率。

（2）尽量吸除上清，为确保上清液全部吸取，请用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。

（三）步骤 3

加 2.5 mL 溶液 P1 至留有菌体沉淀的离心管中 (**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：请务必彻底悬浮细菌沉淀，如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解效果，导致提取量和纯度偏低。对于低拷贝质粒，加大菌体用量的同时按比例增加 P1、P2、E3 和 EBT 的用量。

（四）步骤 4

加 2.5 mL 溶液 P2 至离心管中，立即温和地上下翻转 6 - 8 次，室温放置 5 min。

注意：温和混匀，请勿剧烈震荡，避免基因组 DNA 污染。裂解后菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多导致裂解不彻底，应减少菌体量。

（五）步骤 5

加 1.25 mL 溶液 E3 至离心管中，立即温和地上下翻转 6 - 8 次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀。然后室温放置 2 - 3 min 左右。5,000 rpm(~4,500 xg)离心 10 min，使白色沉淀离心至管底 (**可适当增加离心时间**)，将全部溶液小心（缓慢的）倒入过滤器 CS1 中 (**请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器**)，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的 15 mL 的管中(**自备**)。

注意：加入溶液 E3 后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤器 CS1 中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多 (>50 mL)，推荐延长离心时间至 20 - 30 min。

（六）步骤 6

向滤液中加入等体积溶液 EBT，立即上下翻转 7 - 10 次，充分混匀。

（七）步骤 7

转移 4 mL 混合液至吸附柱 CP7 中 (**吸附柱放入 15 mL 收集管中**)，室温 5,000 rpm(~4,500 xg)离心 3 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP7 重新放回收集管中。重复该步骤直至所有的混合液通过吸附柱 CP7。

（八）步骤 8

加 2 mL 漂洗液 GDE 至吸附柱 CP7 中，5,000 rpm(~4,500 xg)离心 3 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

（九）步骤 9

加入 3 mL 漂洗液 MRDE (**请检查是否已加入无水乙醇**)至吸附柱 CP7 中，5,000 rpm(~4,500 xg)离心 3 min ，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

（十）步骤 10

加 3.5 mL 漂洗液 PWF(**请检查是否已加入无水乙醇**)至吸附柱 CP7 中，5,000 rpm(~4,500 xg)离心 3 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：重复该漂洗步骤一次。

（十一）步骤 11

5,000 rpm(~4,500 xg)离心 10 min，去除吸附柱中残余的漂洗液。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶促反应(酶切、PCR 等)实验。建议将吸附柱 CP7 开盖，置于室温放置数分钟，彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液，以确保下游实验不受残留乙醇的影响。

（十二）步骤 12

将吸附柱 CP7 置于一个干净的 15 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 TB，室温放置 2 - 3 min，然后室温，5,000 rpm(~4,500 xg)离心 5 min。将 15 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℃保存。

注意：可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 12，以增加质粒的回收效率。若用 ddH_2O 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，洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。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，体积过小会影响回收效率。DNA 产物应保存在-20℃，以防降解。

六、质量检测

（一）可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测得到的质粒浓度与纯度。OD260 值为 1 相当于大约 50 μg/mL 双链 DNA。纯化的质粒 OD260/OD280 通常在 1.7 - 1.9 左右，可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对质粒纯度要求很高的实验中。

（二）如果洗脱时使用去离子水而不使用洗脱缓冲液，OD260/OD280 比值会偏低，但并不表示纯度低，因为 pH 值和离子的存在会影响光吸收值。

本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断！