

产品概述

EndoFree Plasmid Maxi Kit 采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一的结合质粒 DNA，提取的质粒纯度高，内毒素含量低，回收率高达 80%-90%。操作便捷，1h 内即可完成实验。使用本试剂盒提取的质粒可用于各种常规操作，包括酶切、PCR 测序、连接、转化、基因治疗、细胞显微注射、基因沉默和转染细胞等多种实验。

试剂组成

Components	BR2D102-00 2 T	BR2D102-01 10 T
Buffer BL	10 mL	30 mL
Buffer E1	30 mL	100 mL
Buffer E2	30 mL	100 mL
Buffer E3	30 mL	100 mL
Buffer PW	15 mL	70 mL
Buffer TB	5 mL	30 mL
RNase A (10 mg/mL)	0.35 mL	1.2 mL
Filtration CS1	2	10
Spin Columns CP1	2	10
Collection Tubes 50 mL	2	10

保存条件

15-30°C 存储。

自备试剂

无水乙醇、异丙醇。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
 2. 第一次使用前，按照说明书在 Buffer E1 中加入全部 RNase A，混匀后置于 2 - 8°C 保存。
 3. 使用前请先检查 Buffer E2 和 Buffer E3 是否出现结晶或沉淀，若有结晶或沉淀现象，可在 37°C 水浴几分钟，即可恢复澄清。
- 注意：Buffer E2 和 Buffer E3 含有刺激性物质，请戴手套操作，使用后应立即拧紧盖子。
4. Buffer PW 第一次使用前请加入无水乙醇。Biori#BR2D102-01 使用前加入 165 mL 无水乙醇；Biori#BR2D102-00 使用前加入 35 mL 无水乙醇。
 5. 使用过滤器 Filtration CS1 时请将推柄小心缓慢地从滤管中抽出，避免滤膜因压力而松动。
 6. 若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 Buffer E1、Buffer E2、Buffer E3 的用量；Buffer TB 推荐在 65°C-70°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。
 7. 高拷贝质粒推荐菌体用量为 100 mL，得率一般在 500 µg-1500 µg；低拷贝质粒推荐菌体用量为 200 mL，得率一般在 200 µg-600 µg。

操作步骤

1.柱平衡步骤:向吸附柱 Spin Columns CP1 中(吸附柱 Spin Columns CP1 放入 Collection Tube 中)加入 2.5 mL 的 Buffer BL, 室温 8,000 rpm 离心 2 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 Spin Columns CP1 重新放回收集管 Collection Tube 中。

注意:用平衡液处理过的柱子请尽快使用。

2.取 100-200 mL 过夜培养的菌液(根据培养菌体的浓度选择合适的量), 加入离心管(自备)中, 室温 8,000 rpm 离心 2-3 min 收集菌体, 尽量吸除上清。

注意:菌液较多时可以通过几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。若菌量较多, 可同时按比例增加 1-2 mL Buffer E1、Buffer E2、Buffer E3 的用量。

3.向留有菌体沉淀的离心管中加入 8 mL Buffer E1 (请先检查是否加入 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:请彻底悬浮细菌沉淀, 如果有未混匀的菌块, 会影响裂解效果, 导致提取量和纯度偏低。

4.向离心管中加入 8 mL Buffer E2, 立即温和的上下翻转 6-8 次, 使菌体充分裂解, 室温放置 5 min。

注意:温和的混匀, 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; 此时菌液应变得清亮粘稠, 如果未变的清亮, 是菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌液量。

5.向离心管中加入 8 mL Buffer E3, 立即温和的上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 至溶液出现白色分散絮状沉淀, 室温放置 10 min。8,000 rpm 离心 10 min, 使白色沉淀离至管底(可适当增加离心时间至 20-30 min), 将全部溶液小心倒入过滤器 Filtration CS1 中, 尽量不要倒入大块沉淀, 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在干净的 50 mL 离心管(自备)中。

注意:加入 Buffer E3 后应立即混匀, 如果离心后倒入过滤器 Filtration CS1 中的溶液中有白色沉淀也不会影响过滤。菌体太多时, 推荐延长离心时间至 20-30 min。

6.加入 0.3 倍上述滤液体积的异丙醇, 上下颠倒混匀后转移到吸附柱 Spin Columns CP1 中, 吸附柱 Spin Columns CP1 放入 50 mL 收集管 Collection Tube 中。室温 8,000 rpm 离心 2 min, 倒掉收集管 Collection Tube 中的废液, 将吸附柱 Spin Columns CP1 重新放回收集管 Collection Tube 中。

注意:吸附柱 Spin Columns CP1 的最大容积为 15 mL, 所以需要分多次过柱, 建议加入吸附柱 Spin Columns CP1 的溶液体积不超过 10 mL, 以防产生漏液现象。

7.向吸附柱 Spin Columns CP1 中加入 10 mL Buffer PW (请检查是否加入无水乙醇), 室温 8,000 rpm 离心 2 min, 弃掉收集管 Collection Tube 中的废液, 将吸附柱 Spin Columns CP1 重新放回收集管 Collection Tube 中。

8.重复操作步骤 7 一次。

9.向吸附柱 Spin Columns CP1 中加入 3 mL 无水乙醇, 室温 8,000 rpm 离心 2 min, 倒掉废液。

10.将吸附柱 Spin Columns CP1 重新放回收集管 Collection Tube 中, 8000 rpm 离心 5 min, 去除残余的乙醇。

注意:置于室温放置 10 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。漂洗液中的乙醇会影响后续的酶促反应, 酶切 PCR 等实验。

11.将吸附柱 Spin Columns CP1 置于一个干净的 50 mL 收集管 Collection Tube 中, 向吸附柱 Spin Columns CP1 的中间滴加 1-2 mL Buffer TB, 室温放置 5 min, 室温 8,000 rpm 离心 5 min, 将 50 mL 收集管 Collection Tube 中的洗脱液 Buffer TB 全部移入一个干净的 1.5 mL EP 管中, -20°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 Spin Columns CP1 中, 重复步骤 11。Buffer TB 推荐在 65°C-70°C 水浴中预热。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响, 若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.5-8.0 范围内, pH 值小于 7.0 会降低洗脱效率。Buffer TB 用量的多少主要依据质粒拷贝数以及实验所需要的浓度来确定, Buffer TB 体积不小于 1 mL, 体积过小影响回收效率。DNA 产物保存在 -20°C, 以防 DNA 降解。