

M5 HiPer EndoFree Plasmid Maxi Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer EndoFree Plasmid Maxi Kit	10T	MF032-plus-01
M5 HiPer EndoFree Plasmid Maxi Kit	5x10T	MF032-plus-05

【储存条件】 室温储存。

【产品简介】

内毒素是质粒提取中常见的污染物，由于真核细胞对内毒素非常敏感，因此，如果质粒中含有内毒素会大大降低真核细胞转染效率。本试剂盒提供一种简单快捷高效提取无内毒素质粒的新方法，在碱裂解法裂解细胞的基础上，采用独特的硅基质膜吸附技术，高效专一结合质粒 DNA；同时采用特殊的缓冲液系统和除内毒素过滤器，有效去除内毒素、基因组 DNA、RNA、蛋白等杂质。整个提取过程只需 40-50 分钟。本试剂盒所得质粒纯度高、提取量大，特别适用于细胞转染，同时也可用于 DNA 测序，PCR，体外转录，内切酶消化等实验。

【推荐每次菌液使用量】

高拷贝质粒推荐使用量为 100 ml，得率一般在 500-1500 μg 左右；最多可以处理 300ml 菌液。
低拷贝质粒推荐使用量为 200 ml，得率一般在 50-300 μg 左右；最多可以处理 300ml 菌液。

【产品组份】

	10T
Buffer P1	125 ml
Buffer P2	125 ml
Buffer E3	125 ml
Buffer PS	30 ml
Buffer PW (concentrate)	50 ml
Endo-Free Buffer EB	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	2ml
Plungers	10 个
Endo-Remover FQ	10 个
Spin Columns DQ with	
Collection Tubes	10 个
Centrifuge Tubes (50ml)	10 个

【自备试剂】 无水乙醇，异丙醇。

【实验前准备及重要注意事项】 **请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项!!!**

- 所有组分可在干燥，室温环境稳定保存一年，将吸附柱置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 可以保存更长时间，加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 可以稳定保存 6 个月。
- Buffer P1 在使用前先加入 RNase A（将试剂盒提供的 RNase A 全部加入），混匀，置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，使用前需在室温中放置一段时间，恢复至室温后使用。
- 第一次使用前应按照试剂瓶标签上的说明在 Buffer PW 中加入无水乙醇。
- 使用前请先检查 Buffer P2 和 Buffer E3 是否出现结晶或沉淀，如果有结晶或沉淀现象，可以在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴几分钟恢复澄清后使用。
- 注意 Buffer P2 和 Buffer E3 含有刺激性物质，请戴手套操作，使用后立即拧紧盖子。
- 使用 Buffer PS 处理过的吸附柱最好立即使用，避免放置时间过长影响使用效果。
- 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度，菌株种类，质粒大小，质粒拷贝数等因素有关。

【操作步骤】

- 1. 收菌:** 取 150ml 过夜培养菌液, 加入离心管 (自备) 中, 12,000xg (约 10,000rpm), 离心 2-3 分钟, 尽可能倒干上清。
<收集超过 50ml 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。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 P1、P2、E3 的用量>。
- 2. 重悬:** 用 **12 ml Buffer P1 (请先检查是否已经加入 RNase A)** 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. 裂解:** 加 **12 ml Buffer P2**, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解, 室温放置 3-5 分钟, 此时溶液应变得清亮粘稠。
<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. 中和:** 加 **12 ml Buffer E3**, 立即温和地上下翻转 8-10 次, 充分混匀此时会出现白色絮状沉淀, 室温放置 5 分钟。12,000 x g 离心 10-15 分钟, 小心取上清至除内毒素过滤器 (Endo-Remover FQ) 中, 慢慢推动推柄 (Plungers) 过滤, 滤液收集在干净的 50ml 离心管 (自备) 中。
<加入 Buffer E3 后应该立即混匀, 以免产生局部沉淀>。
- 5. 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇**, 上下颠倒混匀。
注意: 加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染。
- 6. 柱平衡:** 向已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DQ), 加入 **2 ml Buffer PS**, 12,000 x 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。
- 7. 将步骤 5 中滤液与异丙醇的混合溶液转移到平衡好的吸附柱 (已装入收集管) 中。**
- 8. 6,000-12,000 x 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。
注意吸附柱的最大容积为 15ml, 所以第 7 步中所得溶液分多次过柱。
- 9. 清洗:** 向吸附柱中加入 10ml Buffer PW (**务必请先检查是否已加入无水乙醇!**), 6,000-12,000 x g 离心 2 分钟, 弃掉收集管中废液。
- 10. 重复步骤 9。**
- 11. 甩干:** 将吸附柱放回空收集管中, 12,000 x g 离心 5 分钟, 倒掉废液, 将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。
<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>。
- 12. 洗脱:** 取出吸附柱, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 **1-2ml Endo-Free Buffer EB** (洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热可提高产量), 室温放置 2-5 分钟, 12,000 x g 离心 5 分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。获得的质粒可直接用于后续反应或于 -20°C 以下长期保存。

<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) >。

<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 1 ml, 体积小影响回收效率。DNA 产物应保存在 -20°C, 以防 DNA 降解。>

【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。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 µg/ml 双链 DNA。纯化的质粒 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。