



# EndoFree Plasmid Mini Kit

## 无内毒素质粒小提试剂盒

目录号：CW2106S (50 preps)

保存条件：室温 (15-30°C)

### 产品内容

Component	CW2106S 50 preps
Buffer P1	15 ml
Buffer P2	15 ml
Buffer E3	15 ml
Buffer PS	15 ml
Buffer PW (concentrate)	10 ml
Endo-Free Buffer EB	10 ml
RNase A (10 mg/ml)	150 $\mu$ l
Endo-Remover FM with Collection Tubes	50
Spin Columns DM with Collection Tubes	50

## 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，提取的质粒最大限度去除内毒素，并能有效去除基因组DNA、RNA、蛋白等污染，操作简单方便。

本试剂盒适合提取1-5 ml菌液，在碱裂解法裂解细胞的基础上,通过新型硅基质膜高效专一的结合质粒DNA，每个吸附柱最高可吸附40 µg的质粒DNA，同时采用特殊的缓冲液系统和除内毒素过滤柱，有效去除内毒素、蛋白等杂质。由本试剂盒所得质粒纯度高、质量稳定，特别适用于细胞转染，同时也可用于DNA测序，PCR，基于PCR的突变，体外转录，转化细菌，内切酶消化等下游实验。

**自备试剂：**无水乙醇、异丙醇。

## 实验前准备及重要注意事项

1. 所有组分可在干燥、室温（15-30℃）环境稳定保存1年，将吸附柱置于2-8℃可保存更长时间，加入RNase A的Buffer P1 置于2-8℃可稳定保存6个月。
2. 第一次使用前，将RNase A溶液全部加入到Buffer P1中，混匀，置于2-8℃保存，使用前需在室温中放置一段时间，恢复至室温后使用。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer PW中加入无水乙醇。
4. 使用前请先检查Buffer P2 和Buffer E3是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀现象，可在37℃水浴几分钟，即可恢复澄清。
5. 注意不要直接接触Buffer P2和Buffer E3，使用后应立即盖紧盖子。
6. 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. 取1-5 ml过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，13,000 rpm（~16,200×g）离心30秒收集细菌，尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入**250 μl Buffer P1（请先检查是否已加入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：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，使提取量和纯度偏低。**
3. 向离心管中加入**250 μl Buffer P2**，温和地上下颠倒混匀8-10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。  
**注意：温和混匀，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。如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量。**
4. 向离心管中加入**250 μl Buffer E3**，立即上下颠倒混匀8-10次，此时出现白色絮状沉淀，室温放置5分钟。13,000 rpm离心5分钟，吸取上清，将上清加入过滤柱（Endo-Remover FM）中，13,000 rpm离心1分钟过滤，滤液收集在离心管（自备）中。  
**注意：Buffer E3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。**
5. 向滤液中加入**225 μl异丙醇**，上下颠倒混匀。
6. 柱平衡：向已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DM）中加入**200 μl Buffer PS**，13,000 rpm离心1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. 13,000 rpm离心1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750 μl，如果样品体积大于750 μl可分批加入。**
9. 向吸附柱中加入**750 μl Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇）**，13,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液。
10. 将吸附柱重新放回收集管中，13,000 rpm离心1分钟。  
**注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。**

11. 将吸附柱置于一个新的收集管中，向吸附膜的中间部位加入**50-100  $\mu$ l Endo-Free Buffer EB**，室温放置2-5分钟，13,000 rpm离心2分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20 $^{\circ}$ C保存质粒。

**注意：**1) 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中，室温放置2-5分钟，13,000 rpm离心2分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或>10 kb时，Endo-Free Buffer EB在65-70 $^{\circ}$ C水浴预热，可以增加提取效率。