



## GoldHi EndoFree Plasmid Maxi Kit (Plus) 金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒（加强型）

Cat. No. CW2113

### 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，高效专一的结合质粒DNA；同时采用特殊的去内毒素buffer ER和Endo Remover FQ，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质。同时，配备特殊指示剂CWBlue，保证质粒提取高效完成。

每次可处理100-300mL菌液，所得质粒纯度高、提取量大，获得多至2mg转染级质粒DNA，同时也可用于DNA测序、PCR、体外转录、内切酶消化等实验。

### 储存条件：

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。

## 产品内容

Component	CW2113M 10preps
Buffer P1	125mL
Buffer P2	125mL
Buffer E3	125mL
Buffer PS	30mL
Buffer PW (concentrate)	50mL
Endo-Free Buffer EB	30mL
RNase A (10 mg/mL)	2mL
Buffer ER	50mL
CWBlue	3mL
Spin Columns DZ with Collection Tubes	2×5sets
Endo-Remover FQ	2×5sets
Centrifuge Tubes (50 mL)	2×5sets

## 自备试剂

无水乙醇、异丙醇。

## 注意事项

1. 第一次使用前，按照试剂瓶标签的说明在Buffer PW中加入无水乙醇；第一次使用前，将RNase A溶液全部加到Buffer P1中混匀，于2~8°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。
2. 使用前请先检查Buffer P2、Buffer E3、Buffer ER是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀现象，可在37°C水浴几分钟，即可恢复澄清。
3. 注意Buffer P2和Buffer E3含有刺激性物质，请戴手套操作，使用后应立即盖紧盖子。
4. 使用Buffer PS处理过的吸附柱放置15~30min后再进行混合液过柱，效果较好，不建议放置超过30min使用。
5. CWBlue的使用方法：CWBlue是一种指示剂。请按照CWBlue:溶液P1=1:100进行混合，充分混匀。加入溶液P2至充分混匀后，溶液呈现均一澄清的蓝色，则表明菌体细胞裂解充分；再加入溶液E3至充分混匀后，溶液呈现无色透明，且漂浮有白色絮状沉淀物，表明中和复性反应已充分。

2. 低拷贝质粒: 表2中 $ODV=OD_{600} \times V$ ,  $V$ 为菌液量 (mL), 即单次处理量应不超过表2中推荐的 $ODV=600$ , 对应菌体沉淀湿重约为1.0g, 亦可作为参考 (如需增加菌液量或提高得率则需按表4增加溶液用量)。表2列出了各菌液 $OD_{600}$ 所对应的单次最大使用菌液量 $V$  (mL), P1、P2和E3溶液的用量均为12mL时, 单次使用菌液量应不超过表2中推荐的体积。

表2

低拷贝质粒单次最大使用菌液量, $V$ (mL)						
湿重	ODV	$OD_{600}=2$	$OD_{600}=4$	$OD_{600}=6$	$OD_{600}=8$	$OD_{600}=10$
1.0g	600	300mL	150mL	100mL	75mL	60mL

3. 如需提高质粒得率, 可以适当增加菌液量 (菌液量超过上述表1、表2中推荐使用量时), 同时溶液P1、P2和E3的用量相应进行调整, 高拷贝质粒可参考表3, 低拷贝质粒可参考表4:

表3

ODV	1140	1030	915	800
湿重	2.0g	1.8g	1.6g	1.4g
P1、P2、E3使用量	18mL	16mL	14mL	12mL

表4

ODV	1200	960	780	600
湿重	2.0g	1.6g	1.3g	1.0g
P1、P2、E3使用量	24mL	20mL	16mL	12mL

## 操作步骤 (快速版)

- 取150mL过夜培养的菌液, 加入离心管 (自备) 中,  $12,000 \times g$ 离心2~3分钟收集细菌, 尽量吸弃全部上清。  
**注意: 提取菌液量可参考附件。**
- 向留有菌体沉淀的离心管中加入12mL Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A) 以及120 $\mu$ L CWBlue, 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。**
- 向离心管中加入12mL 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5分钟。此时溶液应变得清亮粘稠。  
**注意: 1) 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。  
2) 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。  
3) 加入溶液P2至充分混匀后, 溶液呈现均一蓝色, 无明显白色絮状物, 则表明菌体细胞裂解充分。**
- 向离心管中加入12mL Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8~10次, 至出现白色沉淀, 室温放置5分钟。  
**注意: Buffer E3加入后应立即颠倒混匀, 避免产生局部沉淀, 溶液呈现无色透明, 并漂浮有松散的豆花状白色沉淀物, 则说明中和充分。**
- 柱平衡: 向已装入收集管中的吸附柱 (Spin Columns DZ) 中加入2mL Buffer PS,  $12,000 \times g$ 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, 待第8步备用。  
**注意: 柱平衡后建议静置15~30分钟待第8步使用 (建议不超过30分钟), 可提升吸附柱性能, 提高提取得率。**
- 第4步完成后,  $12,000 \times g$ 离心10分钟, 将上清全部倒入除内毒素过滤器 (Endo-Remover FQ) 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50mL离心管 (自备) 中。
- 加入0.3倍滤液体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。
- 将上清与异丙醇的混合溶液转移到步骤5已平衡好的吸附柱DZ (已装入收集管) 中。 $12,000 \times g$ 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, 可分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时, 建议加入吸附柱的溶液体积不超过10mL, 以防发生漏液现象。**
- 向吸附柱中加入10mL Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇),  $12,000 \times g$ 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。
- 重复步骤9。

11. 将吸附柱重新放回收集管中，12,000×g离心5分钟，倒掉废液，将吸附柱置于室温5分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。

**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）。

12. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位加入1~3mL Endo-Free Buffer EB，室温放置2~5分钟，12,000×g离心5分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20℃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，12,000×g离心5分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或>10kb时，Endo-Free Buffer EB在65~70℃水浴预热，可以增加提取效率。

### 操作步骤（内毒素去除加强版）

1. 取150mL过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，12,000×g离心2-3分钟收集细菌，尽量吸弃全部上清。

**注意：**提取菌液量可参考附件。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入12mL Buffer P1（请先检查是否已加入RNase A）以及120μL CWBlue，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12mL 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5分钟。此时溶液应变得清亮粘稠。

**注意：**1) 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。

2) 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。

3) 加入溶液P2至充分混匀后，溶液呈现均一蓝色，无明显白色絮状物，则表明菌体细胞裂解充分。

4. 向离心管中加入12mL Buffer E3，立即上下颠倒混匀8-10次，至出现白色沉淀，室温放置5分钟。12,000×g离心10分钟，将上清全部倒入除内毒素过滤器（Endo-Remover FQ）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50mL离心管（自备）中。

**注意：**Buffer E3 加入后应立即颠倒混匀，避免产生局部沉淀，溶液呈现无色透明，并漂浮有松散的豆花状白色沉淀物，则说明中和充分。

5. 加入0.1倍滤液体积的Buffer ER，上下颠倒混匀，冰浴30分钟，再60℃水浴10分钟。

6. 柱平衡：向已装入收集管中的吸附柱（Spin Columns DZ）中加入2mL Buffer PS，12,000×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，待第9步备用。

**注意：**柱平衡后建议静置15-30分钟待第9步使用（建议不超过30分钟），可提升吸附柱性能，提高提取得率。

7. 第5步水浴完成后，立即进行8000rpm室温离心10分钟，此时管底出现黄色油相，将上清转移至干净离心管（自备）中，注意不要吸到底部黄色油相。

8. 加入0.3倍上清体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

9. 将上清与异丙醇的混合溶液转移到步骤6已平衡好的吸附柱DZ（已装入收集管）中。12,000×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，可分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时，建议加入吸附柱的溶液体积不超过10mL，以防发生漏液现象。

10. 向吸附柱中加入10mL Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000×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。

11. 重复步骤10。

12. 将吸附柱重新放回收集管中，12,000×g离心5分钟，倒掉废液，将吸附柱置于室温5分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。

**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）。

13. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位加入1-3mL Endo-Free Buffer EB，室温放置2-5分钟，12,000×g离心5分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20℃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，12,000×g离心5分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2) 质粒拷贝数较低或>10kb时，Endo-Free Buffer EB在65~70℃水浴预热，可以增加提取效率。

### 附：推荐提取菌液量

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。

1. 高拷贝质粒：表1中 $ODV=OD_{600} \times V$ ，V为菌液量（mL），即单次处理量应不超过表1中推荐的 $ODV=800$ ，对应菌体沉淀湿重约为1.4g，亦可作为参考。表1列出了各菌液 $OD_{600}$ 所对应的单次最大使用菌液量V（mL），P1、P2和E3溶液的用量均为12mL时，单次使用菌液量应不超过表1中推荐的体积。

表1

高拷贝质粒单次最大使用菌液量,V (mL)						
湿重	ODV	$OD_{600}=2$	$OD_{600}=4$	$OD_{600}=6$	$OD_{600}=8$	$OD_{600}=10$
1.4g	800	400mL	200mL	133mL	100mL	80mL