



GoldHi EndoFree Plasmid Midi Kit

金牌超量无内毒素质粒中提试剂盒

目录号：CW2581S (10 preps)

保存条件：室温(15-30°C)

产品内容

Component	CW2581S 10 preps
Buffer P1	30 mL
Buffer P2	30 mL
Buffer E3	30 mL
Buffer PS	15 mL
Buffer PW (concentrate)	10 mL
Endo-Free Buffer EB	30 mL
RNase A (10 mg/mL)	600 μ L
Endo-Remover FX	10
Plungers	10
Spin Columns DX with Collection Tubes	10
Centrifuge Tubes (15 mL)	10

产品简介

本试剂盒专门用于从15-50 mL菌液中高效、快速提取质粒。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，每个吸附柱最高可吸附250 μg 的质粒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。由本试剂盒所得质粒纯度高、质量稳定，可用于细胞转染，同时也可用于DNA测序，PCR，体外转录，内切酶消化等实验。

自备试剂

无水乙醇、异丙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 加入RNase A的Buffer P1 置于2-8°C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°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。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在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°C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。
7. 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。

操作步骤

1. 取15-50 mL过夜培养的新鲜菌液，加入离心管（自备）中，5000 \times g离心10分钟收集细菌，尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入2.5 mL 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2.5 mL 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2.5 mL Buffer E3, 立即上下颠倒混匀8-10次, 此时出现白色絮状沉淀。

注意: Buffer E3加入后应立即混匀, 避免产生局部沉淀。

5. 安装过滤器 (Endo-Remover FX) 的滤帽, 将步骤4所得溶液转移至过滤器中, 待白色絮状沉淀浮于溶液上层, 去掉过滤器的滤帽, 对准干净的15 mL离心管 (自备), 慢慢推动推柄 (Plungers) 过滤, 使溶液尽可能多的通过, 将滤液收集在离心管中。

6. 向滤液中加入1/3溶液体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。

7. 柱平衡: 向已装入15 mL离心管的吸附柱 (Spin Columns DX) 中加入1 mL Buffer PS, 2500×g离心2分钟, 倒掉离心管中的废液, 将吸附柱重新放回离心管中。

8. 将步骤6中滤液与异丙醇的混合溶液转移至已平衡的吸附柱 (已装入收集管) 中。

9. 2500×g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4 mL, 所以第8步中所得溶液分2次过柱。

10. 向吸附柱中加入2 mL Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 2500×g离心1分钟, 倒掉收集管中的废液。

11. 重复步骤10。

12. 将吸附柱重新放回收集管中, 2500×g离心2分钟, 倒掉废液, 将吸附柱置于室温干燥5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)。

13. 将吸附柱置于一个新的15 mL离心管中, 向吸附膜的中间部位加入0.5-1 mL Endo-Free Buffer EB, 室温放置2-5分钟, 2500×g离心2分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。-20°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, 2500×g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°C水浴预热, 可以增加提取效率。