



Endo-free Plasmid Maxi Kit 无内毒素质粒小量提取试剂盒

产品特点

Endo-free Plasmid Maxi Kit采用了一种新型的独特的内毒素吸附缓冲液(Buffer ER),能有效去除质粒中的内毒素污染,可大大提高转染实验效率和动物注射效果。无需酚氯仿抽提,无需酒精沉淀。每个纯化柱可用于抽提100-200ml用LB培养过夜的大肠杆菌。抽提所得质粒的OD值一般在1.80左右。所得质粒量会受质粒拷贝数等因素影响,所得的质粒可直接用于转细胞, DNA测序, PCR, 基于PCR的突变, 体外转录, 转化细菌, 内切酶消化。

试剂盒组成

产品编号	P4101	P4105	P4106
次数	5	10	20
纯化柱子	5	10	20
收集管	5	10	20
Solution I	55ml	105ml	105ml*2
Solution II	55ml	105ml	105ml*2
Buffer NT	28ml	55ml	105ml
Buffer ER	6ml	15ml	28ml
Buffer WB	30ml	55ml	110ml
DNA Wash Buffer	13ml	26ml	26ml*2
RNase A	200µl	400µl	800µl
Elution Buffer	6ml	30ml	60ml
说明书	1	1	1

储存和稳定性

RNase -20℃保存,其余组分常温保存。自购买日起18个月内有效。

浓缩的DNA Wash Buffer需用无水乙醇按如下稀释:

- P4101加入52 ml ; P4105与P4106每瓶加入104 ml 无水乙醇

注意事项

- 第一次使用前把试剂盒提供的RNase A全部加到Solution I中, 混匀, 并在瓶上做好标记。加入RNase A后4℃存放。P2101中Solution I含有RNase A。
- 温度较低时, Solution II I可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀, 37℃水浴加热溶解, 混匀后使用。Solution II请勿过分剧烈混匀, 否则会产生大量气泡。
- Solution II使用完后, 一定要盖紧瓶盖, 防止被空气中二氧化碳酸化。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。

操作步骤

1. 用50ml离心管, 取过夜菌50ml毫升, 3500~5000×g离心10分钟收集细菌沉淀, 弃上清。再重复一次, 每管共收集100-200ml毫升 过夜菌沉淀。

如果是低拷贝菌株, 可以用250-300ml菌液, 但Solution I, Solution II, Solution III要按比例增加。

2. 加入10ml Solution I, 重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开。

注意: 确认Solution I中已经添加了RNase A。一定要充分混匀, 对着光亮处观察应呈均匀的悬浊液, 无明显细菌团块或絮块。如果没有vortex, 可以用枪吹打沉淀使沉淀逐渐散开或用手指把沉淀弹开。

3. 加入10ml Solution II, 轻轻颠倒10-15次, 使细菌完全裂解, 溶液透明。

切勿剧烈操作, 否则会导致基因组DNA断裂, 易导致最终所得质粒被基因组DNA污染。

4. 加入5ml 预冷的Solution NT, 随即颠倒离心管4-6次混匀。

切勿涡旋! 颠倒次数也不宜过多, 否则易导致最终所得质粒的质量下降。

5. 最高速(8000-10000rpm左右)室温离心10分钟。

6. 转移上清至新的15ml离心管中, 加入0.1倍体积的Buffer ER, 混匀后冰浴10min。(加入Buffer ER后变得浑浊, 冰浴后又变澄清)。

7. 42℃水浴5min后, 5. 最高速(8000-10000rpm左右)室温离心5分钟。

8. 小心转移上清至新的15ml离心管中(不能吸附到管底下蓝色Buffer ER层)。加入0.5倍体积的无水乙醇, 混匀后转移到质粒纯化柱子上, 3500~5000×g离心3分钟, 倒弃收集管内液体。

9. 在质粒纯化柱内加入5ml Buffer WB, 3500~5000×g离心3-5分钟, 倒弃收集管内液体。

10. 在质粒纯化柱内加入12ml DNA Wash Buffer, 3500~5000×g离心3-5分钟, 倒弃收集管内液体。

注意: 确保 DNA Wash Buffer 已按前面的要求加入无水乙醇。

11. 5000×g再离心10分钟, 除去残留液体并使痕量乙醇完全挥发。

注意: 倒弃收集管内液体后再离心, 此步不能忽略。

12. 将质粒纯化柱置于干净的50ml毫升离心管上, 加入1.5-3ml Elution Buffer至纯化柱上, 放置2分钟。

13. 最高速(不超过~5000×g)离心5分钟, 所得液体即为内毒素含量极低的高纯质粒。

14. (可选)若需获得最高产量, 再加入 1-2ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。静置 3 分钟。最高速(不超过~5000×g)离心5分钟, 建议两次洗脱的分开保存, 以免降低第一洗脱的质粒浓度。

可能出现的问题与对策

问题	可能原因	建议
DNA 产量低	细胞裂解率低	不要使用超过 5ml 的高拷贝质粒培养物或低拷贝质粒培养物。 在加入 Solution I 细胞没有充分混匀，可漩涡振荡悬浮液使之充分混匀。 加入 Solution II 后，延长孵育时间可获得清晰的裂解液。 如果 Solution II 没有盖紧，可能需要重配。
	细菌培养物生长过度或不新鲜	不要于 37°C 培养超过 16 小时，避免培养好的细菌长时间放置。
	使用的是低拷贝数质粒	若 5ml 过夜培养物的产量小于 0.5μg，增加培养物的体积至 10ml，所有溶液按倍增加。
没有 DNA 被洗脱出来	没有用乙醇稀释 DNA Wash Buffer	按前面指导的方法准备 DNA Wash Buffer。
产量中有大分子量的 DNA 污染	加入 Solution II 后过分混和细胞裂解液	加入 Solution II 后不要猛烈振荡或摇匀，轻轻颠倒离心管几次使充分混匀。
琼脂糖凝胶上可见 RNA 带	Solution I 没有加入 RNase A	在每瓶 Solution I 中加入一小瓶 RNase A。
在琼脂糖凝胶上点样时，质粒漂出点样孔	洗脱步骤后，乙醇没有完全从柱子上去除	按操作指南中的步骤 9 离心甩干小柱。

可能用到的产品

货号	品名	规格
P3105	Plasmid Maix Kit	10T
P2105	Endo-free Plasmid Mini kit	50T
P6105	Yeast Plasmid Kit	50T
C4105	MiniElute DNA-Pure Kit	50T
P3415	2XPCR Master Mix	1ml
D1105	Blood DNA Kit	50T
D4105	Plant DNA Kit	50T
D7105	Hpure Fugal DNA Kit	50T
D3105	Baterial DNA Kit	50T
D8105	Soil DNA Kit	50T
R1106	TRNsol(TRIzol)	100ml
R4105	Total RNA Kit II	50T
R5105	Plant RNA Kit	50T
G4210	DH5a 感受态	5*0.2ml
G0668	DEPC-water	100ml
G3420	6X loading buffer	2ml
G3422	DAB 染色液	100ml
G0577	苏木素伊红染色液	50ml*2
G3424	RIPA 裂解液	100ml
P0018	ECL 发光液	100ml
G3418	TMB Solution For Blotting	100ml
G4308	TMB solution For Elisa	100ml
G3005	30%丙烯酰胺 (29:1)	500ml
G3403	40%丙烯酰胺 (37.5:1)	500ml
G0528	4%多聚甲醛	500ml
G3422	BCA 蛋白浓度测定试剂盒	500T
G3155	Bradford 蛋白浓度测定试剂盒	1000T
G4256	10X 丽春红染色液	10ml