



Endo-free Plasmid Mini Kit

无内毒素质粒小量提取试剂盒

产品简介

Endo-free Plasmid Mini 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1-5毫升用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。所得质粒质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	P2101	P2105	P2106	P2107
次数	5	50	100	200
纯化柱子	5	50	100	200
收集管	5	50	100	200
Solution I	2 ml	15 ml	28ml	55ml
Solution II	2 ml	15ml	28ml	55ml
Buffer NT	2ml	12ml	20ml	30ml
Buffer ER	100µl	6ml	10ml	20ml
Buffer WB	3m	30ml	55ml	110ml
DNA Wash Buffer	2ml	13ml	26ml	26ml*2
RNase A	--	50µl	100µl	200µl
Elution Buffer	2ml	15ml	20ml	30ml
说明书	1	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:

- P2101 加8 ml; P2105加入52 ml ; P2106与P2107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.取过夜菌1.5ml, 5000g离心1分钟收集细菌沉淀, 弃上清。再重复一次, 每管共收集不超过5ml过夜菌沉淀。

大肠杆菌用LB培养过夜(16小时左右)室温离心1分钟, 如沉淀不充分则适当延长离心时间。时间过长或离心速度过快会使沉淀过于紧密, 不利于加入Solution I后散开沉淀。直接倒掉上清, 再倒入约1.5ml菌液并重复上述操作。如果细菌密度明显偏低, 可考虑使用更多菌液, 再重复上述操作1-2次。对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过5ml, 对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过10ml。过量的细菌会导致后续的裂解不充分。

2.加入250µl Solution I, 重悬细菌沉淀。确保沉淀完全散开, 无可见细菌团块。

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。如果没有涡旋器, 可以用枪吹打 沉淀使沉淀逐渐散开。

3.加入250µl Solution II, 轻轻颠倒离心管4-6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。颠倒4-6次后, 溶液应变得透明, 无团块或絮状物。

4. 加入125µl 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(12000rpm左右)室温离心10分钟。

6. 转移上清至新的1.5ml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, 室温下12000rpm离心3min。

8. 小心转移上清至新的1.5ml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, 最高速离心30-60秒, 倒弃收集管内液体。

9. 在质粒纯化柱内加入500µl Buffer WB, 最高速离心30-60秒, 洗去杂质, 倒弃收集管内液体。

10. 在质粒纯化柱内加入600µl DNA Wash Buffer, 最高速离心30-60秒, 洗去杂质, 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. 重复第十步用600µl DNA Wash Buffer洗涤一次。

12. 最高速再离心1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。

13. 将质粒纯化柱置于1.5毫升离心管上, 加入50-100µl Elution Buffer至纯化柱上, 放置1分钟。

14. 最高速离心1分钟, 所得液体即为内毒素含量极低的高纯质粒。

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