



EndoFree Plasmid Mini Kit

无内毒素质粒小提试剂盒

Cat.No.: ME-MB0098-50 preps

保存条件: 室温 (15-30°C)

产品内容

Component	ME-MB0098 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 µL
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。

自备仪器、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。

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. 加入0.3倍上清体积的异丙醇, 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200μL 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50-100μL 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℃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℃水浴预热, 可以增加提取效率。