

Endo-Free Plasmid Extraction Midi Kit

无内毒素质粒 DNA 中提试剂盒

本产品适合于从 15~50ml 细菌培养液中提取高达 250 μ g 的质粒 DNA。实验流程可在 80 分钟内完成，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。本试剂盒采用碱裂解法进行裂解，通过 DNA 柱于高盐条件下特异性结合 DNA 的特点，达到纯化的目的。纯化的质粒内毒素低于 1EU/ μ g，可直接用于细胞转染，动物注射等实验。

产品组份

产品编号	DP123-01 (2 T)	DP123-02 (10 T)	DP123-03 (50 T)
RNase Solution	120 μ l	600 μ l	3 ml
Buffer S1	8 ml	30 ml	150 ml
Buffer S2	8 ml	30 ml	150 ml
Buffer S4	8 ml	30 ml	150 ml
Buffer ORT	2 ml	10 ml	50 ml
Buffer W1P	5 ml	15 ml	75 ml
Buffer W2P	5 ml	12 ml	50 ml
Buffer EB	1.5 ml	10 ml	50 ml
DNA Extraction Midi Column	2	10	50
注射管 SY1	2	10	50
过滤器 FC1	2	10	50
15 ml Collection Tube	2	10	50

保存条件

本产品除酶制品外，可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月。低温下，Buffer S2 可能会有沉淀形成，需 37 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于 -20 $^{\circ}$ C，试剂盒使用前，短暂离心 RNase Solution，之后将试剂盒提供的 RNase Solution 全部加入至 Buffer S1 中，并保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

注意 事 项

- Buffer S1 使用前先将 RNase Solution 进行短暂离心，之后全部加入，保存于 2-8℃。
- Buffer W2P 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- 以下离心步骤均在室温进行（20-25℃）
- Buffer S2 及 Buffer S4 对皮肤有一定腐蚀性，不可直接接触。
- Buffer S4 在低温会有白色沉淀析出，须 37℃ 水浴让沉淀完全溶解后再使用，否则会造成产量波动。

实 验 步 骤

1. 取 15~50ml 过夜培养的培养液至离心管中，8000rpm 离心 3 分钟，收集菌体。
若菌液量多，可通过多次离心弃培养液富集菌体。
2. 倒弃培养基，尽量吸尽残液。加入 2.5ml Buffer S1（确保已经加入 RNase Solution），高速涡旋重悬沉淀直至看不到细菌团块。
3. 往重悬液中加入 2.5ml Buffer S2，颠倒混匀 8~10 次，室温放置 5 分钟。
该步骤不可采用涡旋代替颠倒，否则导致基因组 DNA 被打断，提取的质粒中带有基因组 DNA 片段。充分裂解后溶液颠倒应明显有粘稠感觉且表现透亮。
4. 加入 2.5ml Buffer S4，立即颠倒 10~15 次让溶液彻底中和使白色沉淀充分分散。
5. 8000rpm 离心 5~10 分钟。
6. 将过滤器 FC1 与注射管 SY1 连接起来，取出注射管 SY1 活塞，将上清液倒至注射管 SY1 中，过滤器出水口对准 15ml 离心管。将活塞插入注射管中，缓慢推动活塞使液体过滤到 50ml 离心管中。

避免倒入大量沉淀导致过滤器堵塞。
7. 按第 8 或第 9 步进行操作。
8. 简易流程：加入 0.33 倍体积异丙醇至滤液中，涡旋混匀。按第 10 步操作。

9. 高效去除内毒素：加入 0.1 倍体积 Buffer ORT 至滤液，颠倒混匀，冰上放置 10min，期间颠倒混匀数次。之后 45°C 水浴 5 分钟，13,000 x g 离心 5 分钟。转移上层液体至新的离心管中，加入 0.33 倍体积异丙醇至上清液中，涡旋混匀。

转移过程中尽量避免吸入下层液体导致产量下降。

10. 将 DNA Extraction Midi Column 装在收集管中。转移 10~15ml 混合液至柱子中。8000rpm 离心 3 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，重复第 10 步直至所有混合液过柱。

12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 2ml Buffer W1P。8000rpm 离心 3 分钟。

13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 4ml Buffer W2P。8000rpm 离心 3 分钟。

14. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。8000rpm 离心 10 分钟干燥柱子。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 1ml 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

15. 把柱子套在干净的 50ml 离心管中。加入 500 μ l Buffer EB 至柱子的膜中央。静置 5 分钟，8000rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。

16. （可选）将离心得到的洗脱液重新加入至柱子膜中央，静置 5 分钟，8000rpm 离心 2 分钟洗脱 DNA。

洗脱体积较小时，可增加该步骤提高回收效率。

17. 弃去柱子，把质粒保存于 -20°C。

常见问题

1. RNA 污染

- 菌种 RNA 含量较高，加入 Buffer S1 后室温放置 5 分钟充分消化 RNA
- Buffer S1/RNase Solution 放置 2-8℃保存勿超半年。

2. DNA 产量低

- 菌种问题：菌种保存过程中容易出现质粒丢失现象，建议养菌前进行平板活化。
- 菌体应该在 Buffer S1 中充分重悬。
- Buffer W2P 没有加入乙醇稀释。
- 加入 Buffer S4 后应立即颠倒混匀。
- 加入 Buffer S2 裂解后溶液浑浊：菌液量加入较多，减少菌液用量。
- 菌液为低拷贝菌液：可提高菌液用量，等比例增加 Buffer S1/S2/S4 的用量进行提取，并且进行 2 次洗脱，洗脱液进行 70℃预热，其余提取步骤一致。