

AFTSpin EndoFree Plasmid Mini Kit

目录: RK30102

规格: 50 RXN

产品组成:

组分名称	目录号	规格 50 RXN	长期保存
RNase A (10 mg/mL)*	RM30107	125 µL	-20°C
Buffer ER*	RM30108	5 mL	-20°C
Buffer P1**	RM30103	12.5 mL	4°C
Buffer BL***	RM30101	5 mL	RT
Spin Column 2	RM30181	50 个	RT
Collection Tube 2mL	RM30190	50 个	RT
Buffer P2	RM30104	12.5 mL	RT
Buffer N3	RM30106	12.5 mL	RT
Buffer PR****	RM30109	16 mL	RT
Buffer WB*****	RM30110	13 mL	RT
Buffer EB	RM30111	10 mL	RT

*，注: RNase A (10 mg/mL)及内毒素清除剂 ER (Buffer ER) 可短期常温运输，长期保存放-20°C；

**，注: 在首次使用之前将试剂盒所带的全部 RNase A 加入 Buffer P1 后 (终浓度 100 µg/mL) 置于 2-8°C 保存。如果 Buffer P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在 Buffer P1 中补加 RNase A 即可。(或需另购或自备)

***，注: **柱平衡液 BL (Buffer BL) 的使用:** 取一个新的吸附柱 Spin Column 2 装在 Collection Tube 2mL 收集管中，吸取 100 µL 的 Buffer BL 至吸附柱 Spin Column 2 中。12,000 rpm (~13,400 x g) 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管。

Buffer BL 预处理吸附柱后可大大减少柱中硅胶膜的憎水基团，提高核酸的结合能力。从而提高硅胶柱子回收效率或者产量。平衡液是强碱性溶液，若不小心碰到，请用大量自来水清洗。用完后需盖紧瓶盖，以免接触空气。室温保存。在保存过程中可能有沉淀生成，请加热至 37°C 使沉淀完全消失。

****，注: 50 RXN 去蛋白液 Buffer PR 使用前加入 10 mL 无水乙醇；

*****，注: 50 RXN 漂洗液 Buffer WB 使用前加入 52 mL 无水乙醇。

产品说明

本试剂盒采用改进的 SDS-碱裂解法裂解细胞，通过独特的内毒素清除剂 Buffer ER 选择性结合离心除去内毒素。离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过 Buffer PR 和 Buffer WB 将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的 Buffer EB 将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

质粒提取得率和质量与宿主菌的种类和培养条件，细胞的裂解，质粒的拷贝数，质粒的稳定性，抗生素等因素有关。

产品特点

1. 独有的去蛋白液配方，可以高效去除残留的核酸酶，即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除，有效防止质粒被核酸酶降解。
2. 不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
3. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低 (<0.1 EU/ μ g DNA)，细胞转染效果极佳。也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。
4. 快速、方便，获得的质粒产量高、纯度好。一般情况下，高拷贝质粒接种单菌落于 1.5-4.5 mL 加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 12-16 个小时，可提取出多达 20 μ g 的纯净质粒。

保存条件

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。RNase A 和内毒素清除剂 Buffer ER 可短期常温运输，Buffer ER 可在 4°C 放一个月，长期保存放 -20°C。在 2-8°C 保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在 37°C 水浴中预热 10 min 以溶解沉淀。试剂偶有颗粒不影响实验效果。

在首次使用之前将试剂盒所带的全部 RNase A 加入 Buffer P1 后（终浓度 100 μ g/mL）置于 2-8°C 保存。

适用范围

可直接用于细胞转染实验，以及酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

操作说明

实验前准备

1. 首次使用时请按说明分别向去蛋白液 Buffer PR 和漂洗液 Buffer WB 中加入规定量的无水乙醇，充分混匀。加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 首次使用时，将试剂盒所带的全部 RNase A 加入 Buffer P1 后标记（终浓度 100 μ g/mL）置于 2-8°C 保存。如果 Buffer P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在 Buffer P1 中补加 RNase A 即可(或需另购或自备)。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员进行科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 平衡液是强碱性溶液，请注意适当防护，避免直接接触人体。
4. 所有离心步骤均在室温进行，使用转速 $\geq 12,000$ rpm ($\sim 13,400 \times g$)的离心机。
5. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。一般高拷贝质粒，接种单菌落于 1.5-4.5 mL 加合适抗生素的 LB 培养基，过夜培养 12-16 个小时，可提取出多达 20 μg 的纯净质粒。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应适当加大菌体使用量，所用菌量一般不能超过 10 mL（过量的细菌会导致后续的裂解不充分），同时按比例增加 Buffer P1、P2、N3 的用量，其它步骤相同。
6. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保使用水的 pH 大于 7.5。DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，洗脱效率还取决于 pH 值，最大洗脱效率在 pH 7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60°C 后使用，有利于提高洗脱效率。用水洗脱质粒需保存在 -20°C。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱（10 mM Tris-HCl，1 mM EDTA，pH 8.0），但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。
7. 环境温度低时 Buffer P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀，可将试剂 37°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
8. 每次使用后应及时盖紧试剂瓶，以免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。

操作方法（请先阅读注意事项）

1. 取 1.5-4.5 mL 过夜培养的菌液，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心 30 sec，尽可能的倒干上清，收集菌体。
注：离心弃上清后，在同一个 1.5 mL 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。（对于高拷贝质粒所用菌量一般不能超过 5 mL，对于低拷贝质粒所用菌量一般不能超过 10 mL。过量的细菌会导致后续的裂解不充分）。
2. 用 250 μL Buffer P1 重悬菌体沉淀，涡旋振荡至彻底悬浮。如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。如果没有涡旋器，可以用手指轻弹管底，把沉淀弹开。
3. 加 250 μL 的 Buffer P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4 min。
注：温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！颠倒 6-8 次后，溶液应变得透明，无团块或絮状物。如果没有完全散开，或遇到有少量团块或絮状物产生的情况，可以增加颠倒次数 3-5 次，再室温放置 2-3 min，总裂解时间不可超过 5 min。
4. 加 250 μL Buffer N3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀时会出现白色絮状沉淀。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心 10 min，小心取上清。
注：加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。

5. 加入 0.1 倍体积(上清的体积的 10%, 约 80 μ L)的 Buffer ER 到上一步所得上清, 颠倒旋转混匀, 冰浴或者插入碎冰中(或冰箱冷冻室)放置 5 min 直到浑浊变清亮透明(或仍旧稍有浑浊), 中间偶尔混匀几次。
注: Buffer ER 加入上清后, 上清会变得浑浊, 但是冰浴后应恢复清亮(或稍浑浊)。
6. 常温放置 3-5 min, 温度恢复室温溶液很快变为浑浊, 颠倒混匀。
注: 如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42°C 水浴, 将很快变浑浊, 颠倒混匀。
7. 室温 12,000 rpm (~ 13,400 x g)离心 10 min 分相。上层水相含 DNA, 下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管(注意不要吸到蓝色油状层, 里面含内毒素等杂质), 弃油状层。
注: 柱平衡液 BL (Buffer BL) 预处理吸附柱: 使用 Buffer BL 预处理硅胶膜吸附柱为必做步骤, 具体方法如下: 取一个新的吸附柱 Spin Column 2 装在 Collection Tube 2mL 收集管中, 吸取 100 μ L 的 Buffer BL 至吸附柱 Spin Column 2 中。12,000 rpm (~ 13,400 x g)离心 1 min, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱重新放回收集管。此时平衡液预处理柱子完毕, 接后续的操作步骤。
8. 向上层水相中加入 0.5 倍体积异丙醇(约 370 μ L)后充分颠倒混匀后分两次(每次不超过 700 μ L)转入吸附柱 Spin Column 2 中(吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (~ 13,400 x g)离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
9. 加入 500 μ L Buffer PR (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (~ 13,400 x g)离心 30 sec, 弃废液。
注: 此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质, 如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株, 核酸酶含量丰富, 应加此步骤; 如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5 α 等缺陷型菌株, 核酸酶含量低, 则可略过此步骤。
10. 加入 600 μ L Buffer WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (~ 13,400 x g) 离心 30 sec, 弃掉废液。再加入 600 μ L Buffer WB, 重复漂洗一次。
11. 将吸附柱 Spin Column 2 放回空收集管中, 12,000 rpm (~ 13,400 x g)离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
12. 取出吸附柱 Spin Column 2, 放入一个干净的离心管(自备)中, 在吸附膜的中间部位加 50-100 μ L Buffer EB (Buffer EB 事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2min, 12,000 rpm (~ 13,400 x g)离心 1 min。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1 min。
注: 洗脱体积越大, 洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 最小体积不应少于 30 μ L, 体积小降低质粒洗脱效率, 减少质粒产量。
13. 将所得 DNA 洗脱液置于 -20°C 保存或直接用于后续实验。

DNA 浓度、纯度等测定

1. 得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μ g/mL DNA。电泳可能为单一条带, 也可能为 2 条或者多条 DNA 条带, 这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成, 与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。
2. 质粒 DNA 确切分子大小必须经过酶切线性化后, 经琼脂糖凝胶电泳结果来判断。处于环状或者超螺旋状态的质粒, 泳动位置不确定, 无法通过电泳知道其确切大小。