

AFTSpin EndoFree Plasmid Maxi Kit

目录: RK30103

规格: 10 RXN

产品说明

组分名称	目录号	规格 10 RXN	长期保存
RNase A (10 mg/mL)*	RM30107	750 µL	-20 °C
内毒素清除剂 ER (Buffer ER) *	RM30108	25 mL	-20 °C
溶液 P1 (Buffer P1) **	RM30103	75 mL	4 °C
吸附柱 SC3 (Spin Column 3)	RM30182	10 个	RT
收集管 50 mL (Collection Tube 50 mL)	RM30191	20 个	RT
溶液 P2 (Buffer P2)	RM30104	75 mL	RT
溶液 N3 (Buffer N3)	RM30106	75 mL	RT
去蛋白液 PR (Buffer PR) ***	RM30109	65 mL	RT
漂洗液 WB (Buffer WB) ****	RM30110	25 mL X 2 瓶	RT
洗脱液 EB (Buffer EB)	RM30111	20 mL	RT

*, 注: RNase A (10 mg/mL)及内毒素清除剂 ER (Buffer ER) 长期保存需-20°C保存;

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

***, 注: 10 RXN 去蛋白液 PR 首次使用加入 38 mL 无水乙醇;

****, 注: 10 RXN 漂洗液 WB 首次使用每瓶各加入 100 mL 无水乙醇。

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 ER 可短期常温运输, 长期保存放 -20°C, 内毒素清除剂 ER 可在 4°C放一个月。在低温保存条件下, 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。

首次使用之前将试剂盒所带的全部 RNase A 加入溶液 P1 后 (终浓度 100 µg/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。

产品说明

本试剂盒采用改进的 SDS-碱裂解法去裂解细胞。粗提物通过独特的内毒素清除剂选择性结合，离心除去内毒素。柱内硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过去蛋白液 PR 和漂洗液 WB 将杂质和其它细菌成分去除，最后低盐、高 pH 值的洗脱液 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、细胞的裂解情况、质粒的拷贝数、质粒的稳定性和抗生素等因素有关。

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 等，也可以被轻松去除。有效防止了质粒被核酸酶降解。
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。
4. 快速、方便，获得的质粒质量好。从 150-300 mL 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 0.5-2 mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取效率可达 80-90%。

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 PR 和漂洗液 WB 中加入规定量的异丙醇或无水乙醇（用户自备），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 加入溶液 P1 后（终浓度 100 μ g/mL）置于 2-8°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会有微量 RNA 残留，在溶液 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. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 8,000 rpm (~8,200 x g)，带 50 mL 转头的台式离心机。
5. 提取质粒的量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。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，同时按比例增加溶液 P1、P2、N3 的用量，洗脱液 EB 应在 70°C 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
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 pH7.0-8.5 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液 EB 加热至 70°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. 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出浑浊或者沉淀,可在 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,以免避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化。

操作步骤 (请先阅读注意事项)

1. 取 150-200 mL (最多不超过 300 mL) 过夜培养的菌液, 8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 1 min, 尽可能地倒干上清, 收集菌体。

注: 收集超过 50 mL 菌液, 可以离心弃上清后, 在同一个 50 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。

2. 用 7.5 mL 溶液 P1 重悬菌体沉淀, 移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。

注: 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。

3. 加 7.5 mL 的溶液 P2 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解, 室温放置 4-5 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 以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。

4. 加 7.5 mL 溶液 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。8,000 rpm (~8,200 x g) 离心 10-15 min, 小心取上清至新管, 避免吸取到漂浮白色沉淀。

注: 加入溶液 N3 后应该立即混匀, 以免产生 SDS 的局部沉淀。注意切勿震荡, 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. 加入 0.1 倍体积(上清的体积的 10%, 约 2.4 mL) 的内毒素清除剂到上一步所得上清, 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: 内毒素清除剂加入上清后, 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 8,000 rpm (~8,200 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。

8. 向上层水相中加入 0.5 倍体积异丙醇(约 11 mL) 后充分颠倒混匀后分两次(每次不超过 10 mL, 因个别

情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 mL，以防产生漏液现象）转入吸附柱 SC3 中（吸附柱放入收集管中），8,000 rpm (~ 8,200 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. 可选步骤：加入 10 mL 去蛋白液 PR（请先检查是否已加入无水乙醇！），8,000 rpm (~ 8,200 x g) 离心 30 sec，弃废液。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 10 mL 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），8,000 rpm (~ 8,200 x g)离心 30 sec，弃掉废液。再加入 10 mL 漂洗液 WB，重复漂洗一次。
11. 将吸附柱 SC3 放回空收集管中，8,000 rpm (~ 8,200 x g)离心 3 min，以干燥基质膜上残留乙醇。打开盖子室温晾干 2-3 min。该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。
12. 取出吸附柱 SC3，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1-2 mL 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 min，8,000 rpm (~ 8,200 x g)离心 1-2 min。为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 min，8,000 rpm (~ 8,200 x g)离心 1-2 min。洗脱体积越大，洗脱效率越高。如果需要较高浓度质粒，可以适当减少洗脱体积，最小体积不应少于 1 mL，体积过小会降低质粒洗脱效率，影响抽提效果。
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。