

## Endo-free Plus Plasmid Maxi Kit

### 增强型无内毒素质粒大提试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL1181A	增强型无内毒素质粒大提试剂盒	10T

#### 产品简介:

本试剂盒采用改良的碱裂解处理方法及硅胶膜吸附技术，可特异、高效地获得无内毒素高纯度质粒 DNA；独特的内毒素沉淀技术，无需过滤，操作简便。所得质粒可直接用于细胞转染、酶切、连接、转化、PCR、测序等分子生物学实验。高拷贝质粒，100 mL 菌液通常可获得 500~1500 µg 质粒，低拷贝质粒，200 mL 菌液通常可获得 200~600 µg 质粒。

#### 产品特点:

- ◇ 操作简便：采用吸附柱技术特异吸附质粒，无需过滤，操作更为简便；
- ◇ 纯度高：独特的内毒素沉淀技术，内毒素去除效果更佳；
- ◇ 高效转染：适合包括内毒素敏感细胞在内的绝大多数细胞的转染
- ◇ 应用广泛：动植物细胞转染、分子生物学实验均可应用。

#### 产品组分:

编号	组分	规格
BL1181A-1	RNase A (10 mg/mL)	1.1 mL
BL1181A-2	Buffer BL	30 mL
BL1181A-3	Buffer I	110 mL
BL1181A-4	Buffer II	110 mL
BL1181A-5	Buffer III	110 mL
BL1181A-6	Endotoxin Removal Buffer	32 mL
BL1181A-7	Buffer W1 (concentrate)	75 mL
BL1181A-8	Buffer EB	25 mL
BL1181A-9	吸附柱 EC (with Collection Tubes)	10 个
BL1181A-10	Collection Tubes	10 个

#### 有效期:

室温保存 12 个月，Buffer I 加入 RNase A 后置于 2~8°C 保存。

#### 注意事项:

1. 每次使用时需观察 Buffer II 和 Buffer III 是否形成沉淀，如有沉淀于 37°C 溶解后使用；
2. 用平衡液处理过的柱子建议立即使用，放置时间过长影响使用效果；
3. 第一次使用前，按照瓶上标签向 Buffer W1 中加入 175 mL 无水乙醇；
4. 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、质粒的稳定性等因素有关。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品；

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用方法

自备：无水乙醇、异丙醇、50 mL 离心管。

样本处理

1. 柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 2.5 mL 的平衡液 Buffer BL（当天处理），10,000 rpm 离心 2 min，弃去收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中；
2. 取 100~200 mL（对于高拷贝质粒，建议 100 mL 菌液；对于低拷贝质粒，建议 200 mL 菌液，最高不超过 300 mL 菌液）过夜培养的菌液，10,000 rpm 离心 2 min，弃上清；
3. 加入 10 mL Buffer I（使用前将试剂盒提供的 RNase A 全部加入），旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀；

**注：确保菌体沉淀悬浮均匀，含未悬浮菌块会影响裂解，导致提取质粒的浓度及纯度降低。**

4. 加入 10 mL Buffer II，温和颠倒混匀使菌体完全裂解；

**注：不可剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 的污染；所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，可增加 Buffer II 的用量，在后续的操作中按倍数增加 Buffer III 的用量。**

5. 加入 10 mL Buffer III，立即温和颠倒混匀，至溶液出现白色絮状物。10,000 rpm 离心 10 min，小心将上清转移至干净离心管（自备）中（不要带入沉淀）；

**注：**

**(a) Buffer III 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀；**

**(b) 离心后在最上层可能会形成一层致密的漂浮膜，注意不要倒入吸附柱；**

6. 加入 3 mL Endotoxin Removal Buffer，颠倒混匀；
7. 加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，颠倒混匀（加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染）；
8. 将步骤 7 所得混合溶液转移到平衡好的吸附柱 EC (with Collection Tubes) 中，10,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中的滤液（吸附柱最大容积为 15 mL，即上步中所得溶液需分 2~3 次过柱）；

**注：如果离心机转子倾角较大时，建议加入吸附柱的溶液体积不超 10 mL，以防漏液。**

9. 加入 10 mL Buffer W1（检查是否已加入无水乙醇），10,000 rpm 离心 1 min，弃滤液；
10. 重复步骤 9；
11. 将吸附柱 EC 放回空收集管中，10,000 rpm 离心 5 min；
12. 将吸附柱 EC 置于新的 50 mL 离心管中，开盖放置 5 min，彻底挥发乙醇；
13. 在吸附膜的中间部位加入 1~2 mL 洗脱液 Buffer EB（60~65°C 预热效果更好），常温放置 2 min，10,000 rpm 离心 2 min，即得质粒 DNA（如需较多量 DNA，可将得到的溶液重新转入吸附柱，重复此步骤）。

## 常见问题与解决办法

### Q1：质粒 DNA 产量低？

**A1：**

- 1) 质粒拷贝数低、质粒 >10 kb 或革兰氏阳性菌质粒。应加大菌体使用量，可使用 300~500 mL 过夜培养物，Buffer EB 60°C 水浴预热，吸附和洗脱时间可以适当延长，以增加提取效率；
- 2) 菌种问题。菌种保存过程中存在质粒丢失现象，培养细菌前建议先划线活化，以稳定产量；
- 3) 细菌未充分裂解。细菌须在 Buffer I/RNase A 中充分重悬或菌体不宜过多，避免成团或过量的细菌无法裂解降低产量。

### Q2：质粒 DNA 中有基因组 DNA 污染？

**A2：**

- 1) 菌液培养时间太长。菌液培养时间需控制在 12~16 h；
- 2) 裂解问题。加入 Buffer II 时，必须轻柔颠倒混匀；处理多个样品时，从加入 Buffer II 时算起，总时间不要超过 5 min。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

