无内毒素质粒提取

说明书

组分	编号	ZD-EF-MaxI-10
maxI 离心柱		10 个/包×1
Endo-free 过滤柱		10 个/包×1
50 ml 离心管		20 个/包×1
溶液 PA		125ml/瓶×1
溶液 PB		125ml/瓶×1
溶液 PC		125ml/瓶×1
溶液 RE		60ml/瓶×1
溶液 CE		45ml/瓶×1
溶液 TE		60ml/瓶×1
无内毒素水		30ml/瓶×1
70%乙醇		34ml/瓶×1
RNase A		12.5mg/管×1
说明书		1 份

存储和稳定性

- RNase A（固体）置于 4℃ 长期保存。其余试剂室温避光保存。
保质期：12 个月。

产品介绍

产品基于高性能固相基质以及内毒素技术去除专利设计。在一系列试剂作用下，质粒从裂解菌体中释放并吸附于固相基质，洗脱后再去除内毒素，可高效获取内毒素低于 0.1EU/μg 的质粒。

注意事项

- 首次使用前，阅读说明书，熟悉实验步骤及注意事项。如有疑问通过说明书底部的联系方式沟通。
- 产品一次可提取 800 μg 无内毒素质粒。高拷贝质粒推荐菌液用量为 50~100 ml，低拷贝质粒需加大菌液用量。
- 细菌过多或过少时，根据收集细菌体积调整溶液 PA、PB、PC、无水乙醇及 RNaseA 的用量：先估算离心后的细菌沉淀体积，PA 用量为菌沉淀体积的 10~15 倍，溶液 PA、PB、PC 和无水乙醇用量比为 1: 1: 1: 0.5，溶液 PA 中 RNaseA 工作浓度为 100μg/ml。
- 从步骤“11”开始推荐使用无内毒素枪头和容器移取液体。可在其他供应商处购买无内毒素枪头。玻璃器皿可在清洗干净后 250℃ 烘烤 60min 或 180℃ 过夜烘烤以除去内毒素。
- 离心均室温进行，低温不利于去除 RNA。

使用前准备

- 用户自备试剂耗材：80%乙醇（v/v）、无水乙醇、异丙醇（选用）。
- 使用溶液 PB 及溶液 RE 前，观察瓶内液体是否浑浊或沉淀（室温过低时会浑浊或出现沉淀）。如有，37℃ 加热至液体澄清，摇匀后使用。
- 首次使用前，用无内毒素的量器向 70%乙醇瓶中按标签要求加入无水乙醇，摇匀后标记备用。

- 首次使用前,将 RNase A 管快速离心数秒使管内壁酶粉末甩至管底,加入 900 μ l 纯水完全溶解。如酶溶解后未短时间用完,需按每次用量分装成小份并-20 $^{\circ}$ C 保存备用,避免反复冻融使酶活力下降。

操作步骤

(一) 质粒提取

1. 取大肠杆菌过夜培养液 50~100 ml, 8000 $\times$ g 离心 5min, 弃上清液。
2. 向沉淀中加入 7ml 溶液 PA 及 50 μ l RNase A, 充分混悬细菌(细菌必须成单个混悬状态, 否则严重影响得率)。
3. 加入 7ml 溶液 PB, 上下颠倒使液体充分混匀, 室温放置 2~3min。
注: 不可涡旋剧烈振荡, 以免基因组 DNA 污染。当液体澄清粘稠时表明细胞已充分裂解即可进行下一步。放置时间不要超过 5min。当放置 5min 时液体仍未澄清表明菌体过多造成裂解不彻底。
4. 加入 7ml 溶液 PC, 上下颠倒 5~7 次(一上一下为一次)使之充分混匀(如果溶液存在发粘拉丝现象说明未充分混匀)。加入 3.5ml 无水乙醇, 颠倒充分混匀。最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5min。
5. 将上清液全部移入套有收集管的 maxI 离心柱中。8000 $\times$ g 离心 2min。弃去收集管中废液, 将离心柱放回。
6. 加 80%乙醇(自备) 20ml 于离心柱中, 8000 $\times$ g 离心 2min。弃去收集管中废液, 将离心柱放回。
7. 加入无水乙醇(自备) 10ml 于离心柱中, 8000 $\times$ g 离心 1min。弃去收集管中废液, 将离心柱放回。
8. 最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5min。将离心柱从收集管中取出, 放入新的 50ml 离心管中。敞口放置 5~10min(挥发残存乙醇)。

9. 向离心柱中加入 5ml 溶液 TE, 静置 5min, 最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5min。质粒溶液即被洗脱于收集管中。
注: 将溶液 TE 预热至 50~60 $^{\circ}$ C 时使用, 可提高洗脱效率。

(二) 质粒去内毒素

10. 弃去离心柱, 向洗脱液中加入 5ml 溶液 RE(注: 即溶液 RE 添加量与洗脱液的体积相同), 充分颠倒混匀(注: 混匀时必须覆盖所有管壁, 使溶液 RE 可以接触并结合全部内毒素), 室温放置 5min。
11. 加入 3.5ml 溶液 CE(注: 即溶液 CE 添加量为溶液 RE 用量的 0.7 倍), 充分颠倒混匀(注: 混匀时必须覆盖所有管壁, 使溶液 CE 可以接触并沉淀全部内毒素-RE 复合物)。最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5min。
12. 将上清液全部移入套有收集管的 Endo-free 过滤柱中。最高转速($\geq 8000\times g$)离心 5min。
13. 小心弃去收集管盖及过滤柱(弃前确认柱中已无残留液体, 否则再次离心使液体全部滤过)。将全部滤液用无内毒素枪头移入新的 50ml 管中(小心移取液体, 避免碰到原收集管口可能残留的内毒素沉淀)。向滤液中加入等体积的异丙醇(或两倍体积的乙醇), 充分混匀后静置 15min。最高转速($\geq 8000\times g$)离心 10min。弃上清。
14. 加入 70%乙醇 5ml 清洗沉淀。8000 $\times$ g 离心 10min。弃上清。
15. 重复步骤“14”一次。
16. 敞口放置 5~10min, 待乙醇挥发后用适量无内毒素水溶解质粒沉淀。

宁波市重鼎生物技术有限公司

主页: <http://www.genepure.com>

电话: 4008780133