



无内毒素质粒提取

小量说明书

组分	编号	ZD-EF-Mini-50
mini 离心柱		50 个/包×1
mini Endo-free 过滤柱		50 个/包×1
1.5ml 离心管		50 个/包×2
溶液 PA		30 ml/瓶×1
溶液 PB		30 ml/瓶×1
溶液 PC		30 ml/瓶×1
溶液 RE		12ml/瓶×1
溶液 CE		10ml/瓶×1
70%乙醇		18ml/瓶×1
RNase A		200 μ l/管×1 (15mg/ml)
溶液 TE		12ml/瓶×1
无内毒素水		12ml/瓶×1
说明书		1 份

存储和稳定性

- RNase A 长期保存应置于-20℃。添加过 RNaseA 的溶液 PA 置于 2~8℃ 保存。其它试剂室温避光保存。
- 保质期： 12 个月，添加 RNaseA 的溶液 PA 2~8℃ 保存 6 个月。

产品介绍

试剂盒基于高性能的固相基质以及专利的去除内毒素技术，高效获取无内毒素质粒 (<0.1EU/ μ g 质粒 DNA)。在溶液体系的作用下，菌体裂解质粒被释放并吸附于固相基质，洗脱后经内毒素去除步骤后即获得高纯度质粒。提取的质粒 DNA 可适用于各种常规实验操作。

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。
- 产品一次可提取 50 μ g 无内毒素质粒。高拷贝质粒推荐菌液用量为 1~4 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 和无水乙醇的用量：**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。
- 从步骤“10”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：80%乙醇 (v/v)、无水乙醇、异丙醇。
- 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，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，从盒中取出 RNase A 管，短暂离心后将酶液全部移入溶液 PA 瓶中，混匀后标记备用（注意：添加过 RNaseA 的溶液 PA 需 2~8℃ 保存）。1 管 RNase A 用于 1 瓶溶液 PA。

提取步骤

(一)质粒提取

- 取大肠杆菌过夜培养液(高拷贝质粒) 1~4ml 于离心管(自备)中，12000×g 离心 30sec。弃去上清液，向沉淀中加入 200μl 溶液 PA，充分混悬细胞。
- 加入 200μl 溶液 PB，上下颠倒使之充分混匀，室温放置 2~3min。
注：混匀时不可涡旋剧烈震荡，以免基因组 DNA 污染。静置时间越短超螺旋 DNA 比例越高。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。
- 加 200μl 溶液 PC，颠倒混匀。加 100μl 无水乙醇，颠倒混匀。最高转速 (≥12000 ×g) 离心 5min。
- 将上清液全部移入套有收集管的 mini 离心柱中(小心操作，勿吸入絮状物)。12000×g 离心 1min。弃去收集管中废液，将离心柱放回收集管中。
- 向离心柱中加入 80%乙醇(自备) 650μl，12000 ×g 离心 30sec。弃去收集管中废液，将离心柱放回。
- 最高转速 (≥12000 ×g) 离心 2min。
- 将离心柱取出后放入新的 1.5ml 离心管中。向柱中加入 200μl 溶液 TE，室温放置 2~3min。最高转速 (≥12000 ×g) 离心 1min。

(二)质粒去内毒素

- 弃去离心柱，向洗脱液中加入 200μl 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。
- 加入 140μl 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 (≥12000×g) 离心 2min。
- 将上清液全部移入套有收集管的 Endo-free 过滤柱中。最高转速(≥12000×g) 离心 2min。
- 小心弃去过滤柱 (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)。将全部滤液用枪头移入新的 1.5ml 离心管中 (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)。加入等体积的异丙醇，充分混匀后静置 15min。最高转速 (≥12000 ×g) 离心 10min。弃上清。
- 加 500μl 70%乙醇清洗沉淀。最高转速 (≥12000 ×g) 离心 5min。弃上清。
- 重复步骤“12”一次。
- 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