



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2017-09-01

高纯度无内毒素质粒大量提取试剂盒

HighPure Plasmid EndoFree Kit

目录号: ZP106

试剂盒组成	ZP106-1 5次	ZP106-2 10次	ZP106-3 20次
RNaseA (10 mg/ml)	600 μ l	1.2 ml	2 \times 1.2 ml
溶液K1	60 ml	120 ml	240 ml
溶液K2	60 ml	120 ml	240 ml
溶液K4	80 ml	160 ml	2 \times 160 ml
漂洗液W2	30 ml	2 \times 30 ml	4 \times 30 ml
洗脱缓冲液TE	15 ml	30 ml	30 ml
内毒素试剂A	1 ml	2 ml	5 ml
内毒素试剂B	1 ml	2 ml	5 ml
过滤柱FS	5 个	10 个	20 个
吸附柱-收集管 (50 ml)	5 套	10 套	20 套
说明书	1 份	1 份	1 份

客户自备:

干净的50ml离心管，注意检查是否和吸附柱配套；

无内毒素水（注射转染使用无内毒素水，普通转染超纯水即可）

无水乙醇 分析纯及以上级别。耗材应使用盒装无内毒素的。

实验室使用，仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



■ 储存条件

第一次使用前将RNase A加入溶液K1中，混匀后置于2-8℃保存，可稳定保存一年以上。本试剂盒在室温（15-25℃）干燥条件下，可保存1年；更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存条件下，若溶液产生沉淀，应在使用前置于37℃下溶解沉淀。单独包装的RNaseA 在-20℃可稳定保存一年以上。

■ 产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒DNA，纯化多至1.5 mg无内毒素质粒。同时采用过滤器及特殊配制的溶液K4和去内毒素缓冲液，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅1个小时左右，方便快捷。

本试剂盒提取的质粒DNA可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

■ 注意事项：请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液k1在使用前先加入RNase A（**将试剂盒中提供的RNase A全部加入**），混匀，置于2-8℃保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液W2中加入无水乙醇。
3. 使用前先检查溶液K2和溶液K4是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
4. 注意不要直接接触溶液k2，溶液使用后应立即盖紧盖子。
5. 使用过滤柱时请将推柄小心缓慢地从过滤管中抽出，避免滤膜因压力而松动。
6. 提取的质粒量与细菌培养浓度、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10kb的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加溶液k1、k2、k4的用量；洗脱缓冲液推荐在65~70℃水浴中预热。**可以适当延长吸附和洗脱时间，以提高提取效率。**

■ 操作步骤

- 1. 收集菌体**：取菌液50-200ml，加入离心管中，12,000 rpm (~15,000×g) 离心1min，收集沉淀，或者其他转速条件收集亦可。（菌液体积大于离心管，可以多次离心收集）。
- 2. 重悬菌体**：向留有菌体沉淀的离心管中加入10ml溶液K1（请先检查是否已加入RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。（建议彻底悬浮的菌体最好收集在50ml离心管中，以便后续12,000 rpm离心。）
注意：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. 裂解菌体**：向离心管中加入10ml溶液K2，温和地上下翻转3 - 5次，室温静置3-5min使菌体充分裂解。
注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免造成所得产物有基因组DNA污染。菌液应变得均一粘稠表明已充分裂解；如果未变得均一，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应适当减少菌体量。
- 4. 沉淀除杂**：向离心管中加入14ml溶液K4，立即温和地上下翻转3-5次，充分混匀，即出现白色絮状沉淀，且沉淀颗粒不大于5mm。12,000 rpm (~15,000×g) 室温离心1-2min（离心机温度可调节在20℃以上，不可以低温），此时在离心管底部形成沉淀。
注意：**a、溶液K4加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。**
b、低温离心时，可能会出现乳白上清，可37℃温浴2-3min后重新常温离心沉淀。
- 5. 过滤除杂**：将溶液全部倒入过滤柱FS中，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的带刻度50ml的管中，以便方便计量体积。向滤液中加入0.2倍体积的的异丙醇，上下颠倒混匀。
- 6. 上柱吸附**：每次吸取10ml上一步的混合液到吸附柱中（吸附柱放入50ml收集管中），室温10,000 rpm (~11,500×g) 离心10s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中（分多次将50ml管中的液体全部上柱）。
- 7. 漂洗**：向吸附柱中加入10ml漂洗液W2（请先检查是否已加入无水乙醇），10,000 rpm (~11,500×g) 离心10s，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。重复此步骤一次。
- 8. 将吸附柱重新放回收集管中**，12,000 rpm (~15,000×g) 离心5分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。



9. 将吸附柱置于干净的50ml离心管中，超净台通风3-5min（无明显乙醇气味）。
10. 向吸附膜的中间部位悬空滴加1-2ml洗脱缓冲液TE，室温放置5分钟，室温12,000 rpm (~15,000×g)离心2min。将50ml离心管中的洗脱液全部移入一个干净的1.5ml离心管，-20°C保存。如后续实验对EDTA不敏感，建议加入终浓度1mM的EDTA；或使用TE缓冲液（10mM Tris + 1mM EDTA, PH8.0）洗脱。

■ 无内毒素质粒再纯化处理

操作步骤：（常温1.5ml离心机上操作，不可低温。）

注意：需要自备无内毒素TE8.0或ddH₂O；70%乙醇。

1. 将450ul粗提质粒放入1.5ml离心管中，并加入0.1倍的内毒素试剂A混匀；
注意：质粒样本浓度建议200ng/ul以上，但不宜超过2ug/ul；
2. a、在离心管中加入15ul 内毒素试剂B，震荡混匀5-10s至溶液为混浊均匀的液
b、冰浴3min，期间颠倒混匀一次，液体应该由浑浊变为澄清；
c、50°C水浴3min，期间颠倒混匀一次，液体应该由澄清变为浑浊；
d、12,000 rpm (~13,400×g)离心2min，将上层水相转移到新的1.5ml离心管中，弃去下层水相及离心管；极少量的下相污染，不影响提取回收。

注意：内毒素试剂B 粘稠，吸取时应缓慢吸液，通常吸打两次可有效避免气泡吸入。

如担心取样问题，可用万分之一天平校准，15ul相当于15mg。试剂B可以在宽的范围（±5ul）不影响实验结果，推荐±2ul。

3. 重复步骤2 两次；
注意：经一次步骤2后，内毒素不大于500EU/ug，对绝大多数普通转染实验都可不做步骤3；重复步骤2两次后，内毒素量可以达到10EU/ug数量级，经检测可以满足绝大多数注射转染实验。
4. 在离心管中加入2-3倍体积无水乙醇，混匀后通常此时应该出现明显的丝状DNA沉淀；12,000 rpm (~13,400×g)离心1min，弃上清；
5. 加入500-700ul 70%乙醇（自备），震荡5-10s，沉淀重悬，不贴壁即可，6,000-7000 rpm (~4000×g)离心1min，弃上清；
6. 重复步骤5一次。
7. 对于残留的漂洗液，可以8,000 rpm (~6000×g)离心10s，用10ul吸头从沉淀另一侧吸干净去除，超净台通风5min 晾干沉淀。
8. 加入30-100ul TE或水（自备），静置溶解，晾得过干，可能会比较难溶解。