



7. 将上清与异丙醇的混合溶液转移到步骤4已平衡好的吸附柱DZ（已装入收集管）中。12,000×g离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
注意：吸附柱的最大容积为15 mL，所以第7步中所得溶液分多次过柱。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过10 mL，以防发生漏液现象。
8. 向吸附柱中加入10 mL Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000×g离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
9. 重复步骤8。
10. 向吸附柱中加入10 mL Endo-Free Buffer PW，12,000×g离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
11. 将吸附柱重新放回收集管中，12,000×g离心5分钟，倒掉废液，将吸附柱置于室温数分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。
注意：这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。
12. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位加入1-3 mL Endo-Free Buffer EB，室温放置2-5分钟，12,000×g离心5分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20℃保存质粒。
注意：1) 为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，室温放置2-5分钟，12,000×g离心5分钟，将质粒溶液收集到离心管中。
2) 质粒拷贝数较低或>10 kb时，Endo-Free Buffer EB在65 - 70℃水浴预热，可以增加提取效率。

GoldHi EndoFree Plasmid Maxi Kit 金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒

目录号： CW2104S（2 preps）
CW2104M（10 preps）

保存条件： 室温（15-30℃）。

产品内容

Component	CW2104S 2 preps	CW2104M 10 preps
Buffer P1	30 mL	125 mL
Buffer P2	30 mL	125 mL
Buffer E3	30 mL	125 mL
Buffer PS	15 mL	30 mL
Buffer PW (concentrate)	10 mL	50 mL
Endo-Free Buffer PW	30 mL	125 mL
Endo-Free Buffer EB	10 mL	30 mL
RNase A (10 mg/mL)	600 µL	2 mL
Spin Columns DZ with Collection Tubes	2	10
Centrifuge Tubes (50 mL)	2	10

产品简介

内毒素是质粒提取中常见的污染物，由于真核细胞对内毒素非常敏感，因此，如果质粒中含有内毒素会大大降低真核细胞转染效率。本试剂盒提供一种简单高效提取无内毒素质粒的新方法，在碱裂解法裂解细胞的基础上，采用独特的硅基质膜吸附技术，高效专一的结合质粒DNA；同时采用特殊的缓冲液系统和去内毒素buffer，有效去除内毒素、基因组DNA、RNA、蛋白等杂质等。每次可处理100-300mL菌液，获得多至2mg转染级质粒DNA，整个提取过程只需50分钟。本试剂盒所得质粒纯度高、提取量大，特别适用于细胞转染，同时也可用于DNA测序，PCR，体外转录，内切酶消化等实验。

自备试剂

无水乙醇、异丙醇。

注意事项

1. 所有组分可在干燥、室温（15-30℃）环境稳定保存1年，将吸附柱置于2-8℃可保存更长时间，加入RNase A的Buffer P1 置于2-8℃可稳定保存6个月。
2. Buffer P1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。使用前需在室温中放置一段时间，恢复至室温后使用。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在Buffer PW中加入无水乙醇。
4. 使用前请先检查Buffer P2、Buffer E3是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀现象，可在37℃水浴几分钟，即可恢复澄清。
5. 注意Buffer P2和Buffer E3含有刺激性物质，请戴手套操作，使用后应立即盖紧盖子。
6. 使用Buffer PS处理过的吸附柱放置15-30分钟后再进行混合液过柱，效果较好，不建议放置超过30分钟使用。
7. 提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。
8. 质粒提取菌液量应不超过表1和表2中推荐的体积，高拷贝质粒提取的P1、P2和E3溶液的用量均为12 mL；而对于低拷贝质粒提取，P1、P2和E3溶液的用量应根据菌液量调整P1、P2和E3溶液的用量，可参考表3：

表1:

高拷贝质粒最大使用菌液量						
湿重	ODV	OD ₆₀₀ =2	OD ₆₀₀ =4	OD ₆₀₀ =6	OD ₆₀₀ =8	OD ₆₀₀ =10
1.65g	1000	500 mL	250 mL	166 mL	125 mL	100 mL

表2:

低拷贝质粒最大使用菌液量						
湿重	ODV	OD ₆₀₀ =2	OD ₆₀₀ =4	OD ₆₀₀ =6	OD ₆₀₀ =8	OD ₆₀₀ =10
2.0g	1200	600 mL	300 mL	200 mL	150 mL	120 mL

注意：ODV=OD₆₀₀×V，V为菌液量（mL）；推荐OD₆₀₀为1-4。

9. 低拷贝质粒建议使用裂解液体积，详见下表：

表3:

湿重	2.0 g	1.6 g	1.3 g	1.0 g
菌液量	300 mL	250 mL	200 mL	150 mL
P1、P2、E3用量	24 mL	20 mL	16 mL	12 mL

注意：以OD₆₀₀=4时为例。

操作步骤

1. 取150 mL过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，12,000×g离心2-3分钟收集细菌，尽量吸弃全部上清。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入12 mL Buffer P1（请先检查是否已加入RNase A）使用移液器或涡旋振荡器充分混匀，悬浮细菌沉淀。
注意：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，使提取量和纯度偏低。对于低拷贝质粒，作用菌液量较大时需要按比例增加P1、P2、E3的使用量，请参考表3。
3. 向离心管中加入12 mL Buffer P2，温和地上下颠倒混匀8-10次，使菌体充分裂解，室温放置5分钟。此时溶液应变得清亮粘稠。
注意：温和混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组DNA，造成提取的质粒中混有基因组DNA片段。如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量。
4. 此时进行柱平衡：向已装入收集管中的吸附柱（Spin Columns DZ）中加入2 mL Buffer PS，12,000 ×g离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
注意：第4步柱平衡完成后（Buffer PS过柱）直至用于第7步（上清与异丙醇混合液过柱）建议有15-30分钟的时间差，可使提取率提高。
5. 向离心管中加入12 mL Buffer E3，立即上下颠倒混匀8-10次，此时出现白色絮状沉淀，室温放置5分钟。12,000×g离心10分钟，将上清转移至干净离心管（自备）中，注意不要带入沉淀。
注意：Buffer E3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。
6. 加入0.3倍上清体积的异丙醇，上下颠倒混匀。
注意：加入异丙醇过多容易导致RNA污染。