

## Endo-Free Plasmid Extraction Micro Kit

### 无内毒素质粒 DNA 小提试剂盒

本产品适合于从 1~5ml 细菌培养液中提取高达 80 $\mu$ g 的质粒 DNA。实验流程可在 60 分钟内完成，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。本试剂盒采用碱裂解法进行裂解，通过 DNA 柱于高盐条件下特异性结合 DNA 的特点，达到纯化的目的。纯化的质粒内毒素低于 1EU/ $\mu$ g，可直接用于细胞转染，动物注射等实验。

### 产品组份

| 产品编号                          | DP121-01<br>(10 T) | DP121-02<br>(50 T) | DP121-03<br>(250 T) |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| RNase Solution                | 60 $\mu$ l         | 200 $\mu$ l        | 750 $\mu$ l         |
| Buffer S1                     | 6 ml               | 20 ml              | 150 ml              |
| Buffer S2                     | 6 ml               | 20 ml              | 150 ml              |
| Buffer S5                     | 6 ml               | 20 ml              | 150 ml              |
| Buffer ORT                    | 2 ml               | 8 ml               | 40 ml               |
| Buffer W1P                    | 8 ml               | 35 ml              | 180 ml              |
| Buffer W2P                    | 5 ml               | 15 ml              | 2 x 40 ml           |
| Buffer EB                     | 2 ml               | 10 ml              | 50 ml               |
| DNA Extraction Mini Column II | 10                 | 50                 | 250                 |
| 2 ml Collection Tube          | 10                 | 50                 | 250                 |

### 保存条件

本产品除酶制品外，可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月。低温下，Buffer S2 可能会有沉淀形成，需 37 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。RNase Solution 室温运输，收到产品后请保存于 -20 $^{\circ}$ C，试剂盒使用前，短暂离心 RNase Solution，之后将试剂盒提供的 RNase Solution 全部加入至 Buffer S1 中，并保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

## 注意 事 项

- Buffer S1 使用前先将 RNase Solution 进行短暂离心，之后全部加入，保存于 2-8℃。
- Buffer W2P 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- 以下离心步骤均在室温进行（20-25℃）
- Buffer S2 及 Buffer S5 对皮肤有一定腐蚀性，不可直接接触。
- Buffer S2 在低温会有白色沉淀析出，须 37℃ 水浴让沉淀完全溶解后再使用，否则会造成产量波动。

## 实 验 步 骤

1. 取 1~5ml 过夜培养的培养液至离心管中， $13,000 \times g$  离心 1 分钟，收集菌体。  
若菌液量多，可通过多次离心弃培养液富集菌体。
2. 倒弃培养基，尽量吸尽残液。加入 250 $\mu$ l Buffer S1（确保已经加入 RNase Solution），高速涡旋重悬沉淀直至看不到细菌团块。
3. 往重悬液中加入 250 $\mu$ l Buffer S2，颠倒混匀 8~10 次。  
该步骤不可采用涡旋代替颠倒，否则导致基因组 DNA 被打断，提取的质粒中带有基因组 DNA 片段。充分裂解后溶液颠倒应明显有粘稠感觉且表现透亮。
4. 加入 250 $\mu$ l Buffer S5，立即颠倒 10~15 次让溶液彻底中和使白色沉淀充分分散。
5.  $13,000 \times g$  离心 10 分钟。
6. 转移上清液至新的 2ml 离心管中，加入 0.1 倍体积 Buffer ORT，颠倒混匀数次，冰上放置 10min，期间颠倒混匀数次。
7. 45℃ 水浴 5 分钟， $13,000 \times g$  离心 5 分钟。转移上层液体至新的离心管中，加入 0.33 倍体积异丙醇至上清液中，用移液枪吹打混匀。  
转移过程中尽量避免吸入下层液体导致产量下降。
8. 将 DNA Extraction Mini Column II 装在收集管中。用移液枪把 750 $\mu$ l 混合液转移至柱子中。 $13,000 \times g$  离心 60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，重复第 8 步直至所有混合液过柱。

10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W1P 至柱子中。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 600 $\mu$ l Buffer W2P (确保无水乙醇已加入)。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。向 DNA 柱加入 600 $\mu$ l Buffer W2P (确保无水乙醇已加入)。13,000  $\times$  g 离心 10 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000  $\times$  g 离心 2 分钟干燥柱子。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 100 $\mu$ l 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

14. 把柱子套在干净的 1.5ml 离心管中。加入 70-200 $\mu$ l Buffer EB 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟洗脱 DNA。
15. (可选) 将离心得到的洗脱液重新加入至柱子膜中央，静置 1 分钟，13,000  $\times$  g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

洗脱体积较小时，可增加该步骤提高回收效率。

16. 弃去柱子，把质粒保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. RNA 污染

- 菌种 RNA 含量较高，加入 Buffer S1 后室温放置 5 分钟充分消化 RNA
- Buffer S1/RNase Solution 放置 2-8℃保存勿超半年。

### 2. DNA 产量低

- 菌种问题：菌种保存过程中容易出现质粒丢失现象，建议养菌前进行平板活化。
- 菌体应该在 Buffer S1 中充分重悬。
- Buffer W2P 没有加入乙醇稀释。
- 加入 Buffer S5 后应立即颠倒混匀。
- 加入 Buffer S2 裂解后溶液浑浊：菌液量加入较多，减少菌液用量。
- 菌液为低拷贝菌液：可提高菌液用量至 30ml，等比例增加 Buffer S1/S2/S3 的用量进行提取，并且进行 2 次洗脱，洗脱液进行 70℃预热，其余提取步骤一致。