

版本号: FDI1427

FinePure EndoFree Plasmid Maxi Kit

FinePure 大量无内毒素质粒柱式提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: FD909

产品内容:

产品组成	FD909 (8 preps)
Buffer BL	30 ml
Buffer P1	100 ml
Buffer P2	100 ml
Buffer P4	100 ml
Buffer DW2	44 ml
Buffer EB	30 ml
RNase A(10 mg/ml)	1 ml
DNAPure Maxi Spin Columns	8 个
FinePure Maxi Filter Syringe	8 个
50 ml Collection Tubes	16 个

储存条件:

本试剂盒置于室温 (15-25°C) 干燥条件下保存 12 个月。第一次使用前将 RNase A 加入溶液 P1 中, 混匀后置于 2-8°C 保存, 可稳定保存 12 个月以上。单独包装 RNase A 在室温可稳定保存 12 个月以上。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品简介：

本试剂盒采用独特的玻璃纤维素膜吸附技术，高效专一地结合质粒DNA。同时采用精心优化的Buffer P4和过滤器FinePure Maxi Filtration Columns，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需1h，方便快捷。使用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。

推荐每次菌液使用量：高拷贝质粒推荐使用量为100 ml，得率一般在500-1500 µg左右；低拷贝质粒推荐使用量为200 ml，得率一般在200-600 µg左右。

注意事项：

1. 在使用前将全部 RNase A 加入 Buffer P1，混匀，置于 2-8°C 保存。
2. 使用前先检查 Buffer BL、Buffer P2 和 Buffer P4 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在 37°C 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 注意皮肤不能直接接触 Buffer P2 和 Buffer P4，使用后应立即盖紧盖子。
4. 使用过滤器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。
5. 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 10 kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2 和 P4 的用量；洗脱缓冲液推荐在 65-70°C 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）。
6. 实验前使用 Buffer BL 处理吸附柱，可以最大限度激活玻璃纤维素膜，提高得率。
7. 用平衡液处理过的柱子最好立即使用，放置时间过长会影响使用效果。

操作步骤：

使用前请先在 Buffer DW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 DNAPure Maxi Spin Columns 中 **(吸附柱放入 50 ml 收集管中)** 加入 2.5 ml Buffer BL，8,000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。**(用平衡液处理过的柱子最好立即使用)**。
2. 取 100 ml (根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用 200 ml) 过夜培养的菌液加入离心管，室温 8,000 rpm 离心 3 min 收集细菌，尽量吸除上清。

注意：菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌液量以能够充

分裂解为佳，菌液过多会导致裂解不充分从而降低质粒的提取效率。

3. 尽量吸除上清，为确保上清液全部吸取，请用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。
4. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 8 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彻底悬浮细菌细胞沉淀。

注意：请务必彻底悬浮细菌沉淀，如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解效果，导致提取量和纯度偏低。对于低拷贝质粒，加大菌体用量的同时按比例增加 P1、P2、P4 的用量。

5. 向离心管中加入 8 ml Buffer P2，立即温和地上下翻转 6-8 次，使菌体充分裂解，室温放置 5 min。

注意：温和地混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

6. 向离心管中加入 8 ml Buffer P4，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀，然后室温放置 10 min 左右。8,000 rpm 离心 10 min，使白色沉淀离至管底，将全部溶液小心倒入过滤器 FinePure Maxi Filter Syringe 中 (请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器)，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的带刻度的 50 ml 离心管中 (需自备)。

注意：加入溶液 P4 后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤器中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多 (>100 ml)，推荐延长离心时间至 20-30 min。

7. 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇 (加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染)，上下颠倒混匀后转移到吸附柱 DNAPure Maxi Spin Columns 中 (吸附柱放入 50 ml 收集管中)。

注意：过滤后滤液会损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱的最大容积为 15 ml，所以需要分 2 次过柱。

8. 室温 8,000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：第 7 步中所得溶液需要分 2 次过柱，两次过柱均按照操作步骤 8 进行。

9. 向吸附柱中加入 10 ml Buffer DW2 (请检查是否已加入无水乙醇)，8,000 rpm 离心 2 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

10. 重复操作步骤 9 一次。

11. 向吸附柱中加入 3 ml 无水乙醇，室温 8,000 rpm 离心 2 min，倒掉废液。

-
12. 将吸附柱重新放回收集管中，8,000 rpm 离心 5 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。用枪头吸除内圈压环和柱壁之间可能残留的乙醇，打开盖子室温晾干 3-5 min。
注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）实验并影响洗脱效率。
 13. 将吸附柱置于一个干净的 50 ml 收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 2 ml Buffer EB(Buffer EB 需在 65-70°C 水浴中预热 3-5 min)，室温放置 5 min，然后室温 8,000 rpm 离心 2 min。将 50 ml 离心管中洗脱液全部转入一个干净的 1.5 ml 离心管，-20°C 保存。
注意：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，重复步骤 13。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值 7.5-8.0 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量的多少主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定。建议洗脱缓冲液体积为 2 ml，如果需要更高浓度质粒或提取低拷贝质粒，可使用 1 ml，体积过小影响回收效率。DNA 产物应保存在 -20°C，以防 DNA 降解。

可选步骤（如果需要更高浓度的质粒，可进行如下操作）：

14. 每 1 ml 洗脱液加入 1.42 ml 异丙醇以及 0.42 ml 5M NaCl (客户自备)，混匀，室温放置 5 min，8,000 rpm 离心 10 min，小心弃上清。
15. 加入 0.5 ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，室温 8,000 rpm 离心 5 min，小心弃乙醇。
16. 重复操作步骤 15。
17. 空气中干燥沉淀约 5-10 min，根据需要适当体积的 TB 缓冲液溶解沉淀。

质粒 DNA 浓度及纯度检测：

得到的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 µg/ml 双链 DNA。纯化的质粒 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 通常在 1.7-1.9 左右，可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的实验中。