

## MolPure® Endo-free Plasmid Mini Kit

### 无内毒素质粒小量提取试剂盒

#### 产品简介

MolPure® Endo-free Plasmid Mini Kit 适用于从 1-10 mL 大肠杆菌 LB 培养液中快速提取 20-50 µg 纯净的质粒 DNA，具有高效、快速、方便等特点。离心吸附柱中采用的硅基质材料为本公司特有新型材料，配合本公司独特的裂解液配方可以最大限度的回收高纯度 DNA。提取的 DNA 纯度高，内毒素残留极低(<0.1 EU/µg DNA)，细胞转染效果极佳，也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各种分子生物学实验。

#### 产品信息

货号	19021ES08 / 19021ES50 / 19021ES70
规格	5 T / 50 T / 200 T

#### 组分信息

类别	组分编号	组分名称	19021ES08	19021ES50	19021ES70
Part I	19021-A	RNase A (10 mg/mL)	15 µL	125 µL	500 µL
	19021-B	去内毒素溶液 ER (ER Solution E2)	500 µL	5 mL	20 mL
Part II	19021-C	缓冲液 RS* (RS Buffer E2*)	1.5 mL	12.5 mL	50 mL
Part III	19021-D	缓冲液 AC (AC Buffer E2)	500 µL	5 mL	20 mL
	19021-E	DNA 吸附柱 E2 (MolPure® DNA Column E2)	5 个	50 个	200 个
	19021-F	2 mL 收集管 (2 mL Collection Tube E2)	5 个	50 个	200 个
	19021-G	裂解液 LB (LB Buffer E2)	1.5 mL	12.5 mL	50 mL
	19021-H	结合液 BD (BD Buffer E2)	1.5 mL	12.5 mL	50 mL
	19021-I	去蛋白液 PL* (PL Buffer E2*)	1.6 mL	16 mL	63 mL
	19021-J	漂洗液 W* (Wash Buffer*)	1.3 mL	13 mL	50 mL
	19021-K	洗脱液 (Elution Buffer)	1 mL	10 mL	20 mL

#### 储存条件

Part I 组分 -15~-25°C 保存；Part II 组分 2~8°C 保存；Part III 组分室温保存。有效期 1 年。

#### 注意事项

1. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
2. 注意观察各溶液是否有析出或浑浊（尤其冬季等室温为低温环境时），可 37°C 温浴复溶至溶液澄清，避免影响使用效果。
3. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 12,000 rpm 的台式离心机。
4. 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，同时按比例增加缓冲液 RS\*、裂解液 LB 及结合液 BD 用量。洗脱缓冲液应在 70°C 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。

5. 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA。电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。
6. 质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
8. 本产品仅作科研用途！

## 使用说明

### 实验前准备

1. 自备设备和试剂：台式离心机、振荡仪、水浴锅或金属浴，异丙醇，离心管等。
2. 除特殊指明外，所有的离心步骤均在室温完成，使用可以达到 12,000 rpm 转速的传统台式离心机。
3. 首次使用前，将 RNase A (10 mg/mL) (19021-A) 加入缓冲液 RS<sup>+</sup> (19021-C) 瓶中，充分混匀后使用，并做好标记。每次使用后置于 4°C 保存。
4. 首次使用前，在去蛋白液 PL<sup>+</sup> (19021-I) 瓶中按照下表加入标签指定量的无水乙醇，充分混匀后使用，并做好标记。
5. 首次使用前，须在漂洗液 W<sup>+</sup> (19021-J) 瓶中加入 4 倍体积的无水乙醇，充分混匀后使用，并做好标记。如果发现漂洗液 W<sup>+</sup> 由于运输或保管不当造成容量严重不准，请用量筒定容后再加入 4 倍体积的无水乙醇。每次使用后将瓶盖盖紧，以保持漂洗液 W<sup>+</sup> 中的乙醇含量。

### 操作方法

#### 一、样本预处理：

1. 取 1.5-5.0 mL 过夜培养的菌液（可多次分装菌液至同一个 1.5 mL 离心管），10,000 rpm 离心 1 min，弃上清液，收集菌体。

【注】：对于低拷贝质粒或 > 10 kb 的质粒，建议适当加大菌体量，并等比例增加缓冲液 RS<sup>+</sup>、裂解液 LB 及结合液 BD 用量。如使用收集超过 1.5 mL 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5 mL 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

2. 加入 250  $\mu\text{L}$  缓冲液 RS<sup>+</sup>，吹打或涡旋重悬菌体沉淀。

【注】：确保菌体彻底重悬。

3. 加入 250  $\mu\text{L}$  裂解液 LB，温和上下翻转 6-8 次以充分裂解菌体。室温放置 4 min。

【注】：菌体裂解应温和进行，避免造成基因组 DNA 剪切断裂。放置时间不应超过 5 min。

【注】：裂解后的菌液应清亮粘稠。若出现浑浊，可能为菌体裂解不彻底，可考虑减少菌体使用量。

4. 加入 250  $\mu\text{L}$  结合液 BD，立即温和上下翻转 6-8 次充分混匀。12,000 rpm 离心 10 min，小心收集上清。

【注】：避免吸取到漂浮白色沉淀。

5. 柱平衡：向 DNA 吸附柱 E2 中加入 100  $\mu\text{L}$  缓冲液 AC，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，备用。

【注】：缓冲液 AC 可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。

6. 加入 0.1 体积(上清的体积的 10%)的去内毒素溶液 ER (约 75  $\mu\text{L}$ ) 到上一步所得上清，颠倒旋转混匀。

7. 向上一步得到的混合液中加入 0.5 倍体积异丙醇 (约 370  $\mu\text{L}$ ) 后充分颠倒混匀后，分多次转移混合液至 DNA 吸附柱 E2 中，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

【注】：混合液每次最大加入体积 700  $\mu\text{L}$ ，可分多次离心。

## 二、质粒 DNA 提取：

1. 加入 500  $\mu\text{L}$  去蛋白液  $\text{PL}^*$ ，12,000 rpm 离心 1 min，弃废液。

【注】：确保去蛋白液  $\text{PL}^*$  已添加无水乙醇。

2. 将 DNA 吸附柱 E2 放回收集管，加入 600  $\mu\text{L}$  漂洗液  $\text{W}^*$ ，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃废液。

【注】：确保漂洗液  $\text{W}^*$  已添加无水乙醇。

3. 重复一遍步骤 2。

4. 将 DNA 吸附柱 E2 放回收集管，空柱 12,000 rpm 室温离心 3 min，以除去残留的漂洗液  $\text{W}^*$ 。

5. 将 DNA 吸附柱 E2 放入新的 1.5 mL 离心管中，在 DNA 吸附柱 E2 中央加入 50-100  $\mu\text{L}$  洗脱液，室温放置 2 min。然后 10,000 rpm 离心 2 min。收集滤液，即为 DNA 溶液。

【注】：可通过以下方式提高回收产量：①70°C 预热洗脱液；②将 DNA 滤液再次上柱，室温放置 2 min 后，洗脱。洗脱两遍可提高浓度约 10%。洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量（最小不应少于 30  $\mu\text{L}$ ）。

【注】：洗脱液不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。

6. 质粒 DNA 溶液可置于 -20°C 长期保存。

### 附录：增强型内毒素清除步骤

如果用户需要转染的是原代培养细胞等比较脆弱的细胞系或者提取后转染效果不佳的困难细胞系，推荐加做以下增强型内毒素清除步骤，以便进一步更彻底的清除内毒素，达到最佳转染效果！

#### 一、样本预处理：

1. 取 1.5-5.0 mL 过夜培养的菌液（可多次分装菌液至同一个 1.5 mL 离心管），10,000 rpm 离心 1 min，弃上清液，收集菌体。

【注】：对于低拷贝质粒或 >10 kb 的质粒，建议适当加大菌体量，并等比例增加缓冲液  $\text{RS}^*$ 、裂解液  $\text{LB}$  及结合液  $\text{BD}$  用量。如使用收集超过 1.5 mL 菌液，可以离心弃上清后，在同一个 1.5 mL 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。

2. 加入 250  $\mu\text{L}$  缓冲液  $\text{RS}^*$ ，吹打或涡旋重悬菌体沉淀。

【注】：确保菌体彻底重悬。

3. 加入 250  $\mu\text{L}$  裂解液  $\text{LB}$ ，温和上下翻转 6-8 次以充分裂解菌体。室温放置 4 min。

【注】：菌体裂解应温和进行，避免造成基因组 DNA 剪切断裂。放置时间不应超过 5 min。

【注】：裂解后的菌液应清亮粘稠。若出现浑浊，可能为菌体裂解不彻底，可考虑减少菌体使用量。

4. 加入 250  $\mu\text{L}$  结合液  $\text{BD}$ ，立即温和上下翻转 6-8 次充分混匀。12,000 rpm 离心 10 min，小心收集上清。

【注】：避免吸取到漂浮白色沉淀。

5. 柱平衡：向 DNA 吸附柱 E2 中加入 100  $\mu\text{L}$  缓冲液  $\text{AC}$ ，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，备用。

【注】：缓冲液  $\text{AC}$  可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。

6. 加入 1/10 上清体积的去内毒素溶液  $\text{ER}$ （约 75  $\mu\text{L}$ ），颠倒混匀，冰浴 5 min 至溶液变清亮透明（或稍有浑浊）。冰浴过程中，颠倒混匀 2-3 次。

7. 室温（25°C）放置 5 min，待溶液恢复浑浊后，颠倒混匀。

【注】：室温温度较低时，可 37°C 水浴以便恢复浑浊。

8. 室温 12,000 rpm 离心 10 min 分层。上层水相为 DNA，下层蓝色油状相为内毒素等物质。**小心**收集上层水相至新离心管。
9. 向**第 8 步**得到的上清中加入 0.5 倍体积**异丙醇**（约 370  $\mu\text{L}$ ）后充分颠倒混匀，分多次转移混合液至 **DNA 吸附柱 E2** 中，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

**【注】**：混合液每次最大加入体积 700  $\mu\text{L}$ ，可分多次离心。

## 二、质粒 DNA 提取：

同上步骤