

# M5 Vac Endofree Hipure plasmid Maxi kit

## 抽滤法无内毒素质粒大提使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Vac Endofree Hipure plasmid Maxi kit	10T	MF876-01

**【储存条件】** 室温储存。

### 【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。本试剂盒提供一种快速、易大规模质粒制备的新方法。每次可处理 100-300 ml 菌液，获得多至 2 mg 转染级质粒 DNA。使用真空装置可同时纯化多个样本，45 分钟即可完成质粒提取，有效减少手动操作时间。特殊的缓冲液系统和除内毒素过滤器，有效去除内毒素、基因组 DNA、RNA、蛋白等杂质。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。

### 【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  $\mu\text{g}$  左右；最多可以处理 300ml 菌液。  
低拷贝质粒推荐使用量为 200 ml，得率一般在 50-300  $\mu\text{g}$  左右；最多可以处理 300ml 菌液。

### 【产品组份】

	10T
Buffer P1	125 ml
Buffer P2	125 ml
Buffer E3	125 ml
Buffer PS	30 ml
Buffer PW (concentrate)	50 ml
Endo-Free Buffer EB	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	2 ml
Plungers	10 个
Endo-Remover FQ	10 个
DNA-Binding Tubes	10 个
VacConnectors	10 个
Centrifuge Tubes (50ml)	20 个

### 【自备试剂】

无水乙醇、异丙醇、真空泵、废液收集装置、真空纯化装置。

### 【实验前准备及重要注意事项】 **请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项!!!**

- 所有组分可在干燥、室温（15-30 $^{\circ}\text{C}$ ）环境稳定保存 1 年，将吸附柱置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$  可保存更长时间，加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$  可稳定保存 6 个月。
- 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 $^{\circ}\text{C}$  保存。使用前需在室温中放置一段时间，恢复至室温后使用。
- 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。
- 使用前请先检查 Buffer P2 和 Buffer E3 是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀现象，可在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴几分钟，即可恢复澄清。
- 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。
- 使用 Buffer PS 处理过的吸附柱最好立即使用，避免放置时间过长影响使用效果。
- 请准备废液收集装置/缓冲瓶 MFE100、真空纯化装置 MFE200、真空泵 MFE300。



真空泵

废液收集装置/缓冲瓶

真空纯化装置

### 【操作步骤】

1. 取 100-300 ml 过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中， $12,000\times g$  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。**

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 3-5 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. 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。将溶液全部倒入除内毒素过滤器（Endo-Remover FQ）中，慢慢推动推柄（Plungers）过滤，滤液收集在干净的 50 ml 离心管（Centrifuge Tubes）中。

**注意：1) Buffer E3 加入后应立即混匀，避免产生局部沉淀。**

2) 加入 E3 后，若出现沉淀过多的情况，可  $12,000\times g$  离心 10 分钟后，再将上清溶液倒入除内毒素过滤器中。

5. 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

**注意：加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染**

6. 正确连接负压装置，将连接管（VacConnectors）与 DNA 吸附柱（DNA-Binding Tubes）连接好后插到负压装置的插口上。

**注意：确保连接管和吸附柱连接稳固，防止发生漏气。**

7. 柱平衡：向 DNA 吸附柱（DNA-Binding Tubes）中加入 2 ml Buffer PS，开启并调节负压至  $-300\sim -700$  mbar，吸去柱上溶液。

8. 将步骤 5 中滤液与异丙醇的混合溶液转移到平衡好的吸附柱中，吸去柱上溶液。

9. 向 DNA 吸附柱（DNA-Binding Tubes）中加入 10 ml Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），吸去柱上溶液。

10. 重复步骤 9。

11. 保持负压抽吸 10 分钟，除去吸附膜内残留漂洗液，干燥吸附膜。若一次抽吸 6 个样品以上，可将负压抽吸时间适当延长。待吸附膜彻底干燥后，关闭负压开关。

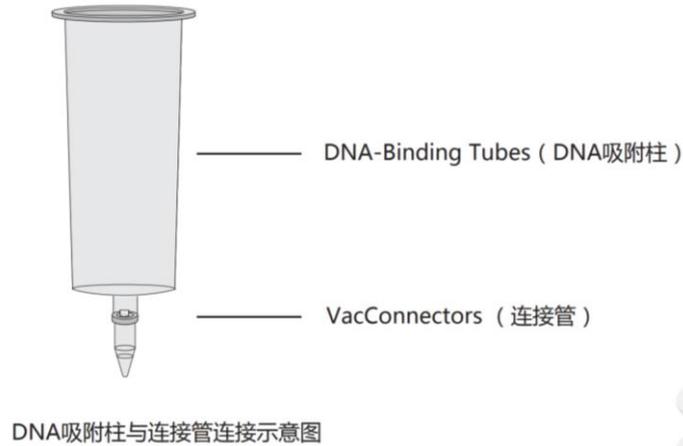
**注意：1) 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。**

2) 根据吸附膜干燥情况，决定负压装置抽吸时间。如未彻底晾干，也可增加烘干步骤， $65^{\circ}\text{C}$  烘干 30 min 以彻底晾干吸附膜内残余的溶液。

12. 将压力恢复至 0 mbar 时，取下吸附柱，将 DNA 吸附柱置于一个新的 50 ml 离心管（Centrifuge Tubes）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， $12,000\times$  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 DNA 吸附柱（DNA-Binding Tubes）中，室温放置 2-5 分钟， $12,000\times$  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。



### 【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。OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA。纯化的质粒 DNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 通常在 1.8-2.0 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。

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。