无内毒素质粒中量提取试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF108

产品内容

产品组成	GF108-01 (10 preps)
溶液 P1 (Buffer P1)	60 ml
溶液 P2 (Buffer P2)	60 ml
溶液 E3 (Buffer E3)	60 ml
溶液 BCE (Buffer BCE)	31 ml
去内毒素溶液 ER (Endotoxin Removal Buffer ER)	24ml(使用前请先加入 16ml 的异丙醇)
漂洗液 PW (Buffer PW)	15ml（使用前请先加入 60ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.5 ml
吸附柱 CP3 (Spin Columns CP3)	10 套

储存条件

第一次使用前将RNase A 加入溶液P1中，混匀后置于2-8℃保存，可稳定保存12个月。单独包装的RNase A 在室温可稳定保存12个月。本试剂盒在室温(15-25℃)干燥条件下，可保存12个月；更长时间的保存可置于2-8℃。2-8℃保存时，若溶液产生沉淀，应在使用前置于37℃溶解沉淀。

产品简介

本试剂盒采用独特的硅胶膜吸附技术，高效专一地结合质粒DNA。同时采用特殊的结合液和去内毒素漂洗液，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50ml，得率一般在250-750ug左右；低拷贝质粒推荐使用量为100ml，得率一般在100-300ug左右。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 溶液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。
2. 使用前先检查溶液P2、溶液E3是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在37℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 去内毒素溶液 ER 在多次开盖使用后，可能会有细微的颜色变化，不影响最终质粒提取效率和纯度。
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10kb的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加P1、P2、E3的用量；**洗脱缓冲液推荐在65-70℃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）**。

操作步骤

使用前请先在漂洗液PW中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 取20-50ml(**根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用100ml**)过夜培养的菌液加入离心管，室温

10,000rpm(~11,500×g)离心3min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。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入5ml溶液P1(**请先检查是否已加入RNase A**)，使用移液器吸吐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、E3的用量。

3. 向离心管中加入5ml溶液P2，立即温和地上下翻转6-8次，室温放置2-4min。

注意：温和地混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA；所用时间不应超过5min，以免形成单股DNA而影响后续酶实验；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。

4. 向离心管中加入5ml溶液E3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，10,000rpm(~11,500×g)离心10min。

注意：加入溶液E3后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果菌体过多(>50ml)，推荐延长离心时间至20-30min。

5. 将上一步收集的上清液小心移至另一新的50ml离心管（自备），加入10ml异丙醇**（需自备）**，上下翻转6-8次，充分混匀，10,000rpm(~11,500×g)离心10min,保留管底的白色沉淀（DNA pellet），丢弃上清液。

6. 向离心管（底部有离心所得的白色沉淀）加入1ml溶液BCE，用移液器吸吐使白色沉淀（DNA pellet）完全溶解。

7. 将上一步所得溶液（DNA 溶液）转移至吸附柱 CP3 中(**吸附柱放入 15ml 收集管中**)，放置 1min，10,000rpm(~11,500×g)离心 2min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放回收集管中。

8. 向吸附柱 CP3 中加入 2ml 溶液 BCE 溶液，放置 2min，10,000rpm(~11,500×g)离心 2min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。

9. 向吸附柱CP3中加入3.5ml去内毒素漂洗液ER，放置2min，10,000rpm(~11,500×g)离心2min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱CP3重新放回收集管中。

10. 向吸附柱CP3中加入3.5ml漂洗液PW(**请检查是否已加入无水乙醇**)，10,000rpm(~11,500×g)离心2min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱CP3重新放回收集管中。

11. 重复操作步骤10。

12. 接着10,000rpm(~11,500×g)离心5min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

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。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱CP3开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

13. 将吸附柱CP3置于一个干净的15ml收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加0.5-1ml洗脱缓冲液TB，室温放置2min，然后室温10,000rpm(~11,500×g)离心2min，将15ml离心管中的洗脱液全部移入一个干净的1.5ml离心管，-20℃保存。

注意：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，洗脱缓冲液体积不应少于0.5ml，体积过小影响回收效率。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值在7.5-8.0范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率。DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置2min，10,000rpm(~11,500×g)离心2min，将质粒溶液收集到离心管中。