无内毒素质粒大提试剂盒

（离心柱型）
目录号：GF120

产品内容

产品组成	GF120-02 / (10 preps)
溶液 P1 (Buffer P1)	120 ml
溶液 P2 (Buffer P2)	120 ml
溶液 P3 (Buffer P3)	120 ml
去内毒素溶液 ER (Endotoxin Removal Buffer ER)	72ml(使用前请先加入 48ml 的异丙醇)
漂洗液 PW (Buffer PW)	50ml（使用前请先加入 200ml 无水乙醇）
洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.5ml×2
过滤器 CS2 (Filtration CS2)	10 个
吸附柱 CP4 (Spin Columns CP4)	10 个
收集管(50 ml) (Collection Tubes 50 ml)	20 个

储存条件

该试剂盒置于室温(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℃保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在37℃水浴中预热10min，以溶解沉淀。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个月以上。

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。同时采用去内毒素溶液和过滤器，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100ml，得率一般在500-1500ug左右；低拷贝质粒推荐使用量为200ml，得率一般在50-300ug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 和 P3 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. 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。
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，同时按比例增加溶液 P1、P2、P3 的用量；洗脱缓冲液 TB 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。
5. 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。

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100ml（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8,000rpm(~8,228×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。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，同时按比例增加溶液P1、P2、P3的用量。

2. 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。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入10ml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、P3的用量。

4. 向离心管中加入10ml溶液P2，立即温和地上下翻转6-8次，使菌体充分裂解，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，以免质粒受到破坏；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。

5. 向离心管中加入10ml溶液P3，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10min左右。8,000rpm(~8,228×g)离心10min，使白色沉淀离心至管底（**可适当增加离心时间**），将全部溶液小心倒入过滤器CS2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50ml的管中（自备）。

注意：加入溶液P3后应立即混匀，避免产生局部沉淀。如果离心后倒入过滤器CS2中的溶液有白色沉淀也不会影响过滤。如果菌体过多（ >100ml），推荐延长离心时间至20-30min。

6. 将上一步收集到的滤液转移到吸附柱CP4中**(吸附柱放入50ml收集中)**，室温8,000rpm(~8,228×g)离心2min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP4重新放回收集管中。

注意：吸附柱CP4的最大容积为15ml，所以需要分2次过柱，每次均按以上条件操作。个别情况下离心机转子倾角较大，此时，建议加入吸附柱CP4的溶液体积不超过10ml，以防产生漏液现象。

7. 向吸附柱CP4中加入10ml去内毒素溶液ER（**已加入异丙醇**），静置2min以平衡管柱膜，于8,000rpm(~8,228×g)离心1min,丢弃滤液，将吸附柱CP4重新放回收集管中。
8. 向吸附柱CP4中加入10ml漂洗液PW**(请先检查是否已加入无水乙醇)**，8,000rpm(~8,228×g)离心2min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
9. 重复操作步骤8一次。
10. 将吸附柱CP4重新放回收集管中，8,000rpm(~8,228×g)离心5min，然后将吸附柱CP4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。

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。

11. 将吸附柱CP4置于一个干净的50ml收集管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加1-2ml洗脱缓冲液TB，室温放置5min，然后室温8,000rpm(~8,228×g)离心5min。将50ml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1ml，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，8,000rpm(~8,228×g)离心2min，将质粒溶液收集到离心管中。