



S6 Easy-High Extreme-endotoxin Plasmid Maxi Kit

“易高得” 极限无内毒素质粒大提 使用说明书

产品名称

单位货号

S6 Easy-High Extreme-endotoxin Plasmid Maxi Kit10T S6995-01

【储存条件】

15-25°C干燥条件下，可保存 12 个月；更长时间的保存可置于 2-8°C。单独包装的 RNase A 在室温可稳定保存 12 个月。加入 RNase A 后的 Solution I 应置于 2-8°C 保存，可稳定保存 6 个月。若溶液 II 和 N4 产生沉淀，应在使用前置于 37°C 下溶解沉淀后再使用。

【产品简介】

本试剂盒适用于无内毒素高纯度质粒 DNA 的大量制备与纯化，柱上去除内毒素，操作简单。菌体经改良的碱裂解处理，质粒可从菌体中释放出来，并特异、高效地被离心柱硅胶膜吸附。通过去蛋白液和漂洗液的清洗可去除蛋白及其他杂质，最后得到高纯度的无内毒素质粒 DNA，所得质粒可直接用于酶切、转化、PCR、测序、细胞转染等分子生物学实验。

【产品特色】

- 1.快捷、高效：颜色变化，适合判断；操作简便，得率高，节约时间；
- 2.纯度高：沉淀致密，去杂干净；
- 3.内毒素去除简单：柱上去除内毒素，方便快捷，清除干净。

【产品组份】

试剂盒成分	10 T
Buffer BL	25 ml
Solution I	100 ml
Solution II	100 ml
Solution N4	100 ml
ToxinOut Buffer	60 ml
Buffer WB2 (concentrate)	60 ml
Buffer EB	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	1 ml
MaxiSpin Columns with Collection Tubes (50 ml)	10 个
Collection Tubes (50 ml)	10 个

(注意：使用前将全部 RNase A 溶液加到 Solution I 中混合均匀，2-8°C 保存；按要求在 Buffer WB2 中加入无水乙醇)

【注意事项】

- 1.细菌培养时间一般为 12-16 小时（用锥形瓶或者试管摇菌，建议容器体积是菌液的 3-5 倍，留够足够的空间让细菌接触空气，利于细菌生长），如接种量大则应减少培养时间，过度培养会降低质粒质量甚至导致质粒 DNA 突变；
- 2.每次使用时都需要注意 Solution II 和 N4 是否形成沉淀，如有沉淀 37°C 溶解后再用；
- 3.加入 Solution II 裂解细菌，直至溶液成紫红色粘稠透明状，时间过长会导致质粒 DNA 打断变性；
- 4.质粒的产量跟细菌量、质粒拷贝数、质粒大小和操作规范程度密切相关。

【操作步骤】

柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 2.5 ml 的平衡液 BL，10, 000 rpm 离心 2 min，弃收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。（当天处理过的柱子可提升 10-20%回收效率）



- 1.取 100 ml (低拷贝质粒可收集更多菌液, 最高 200ml 菌液) 过夜培养的菌液, 室温 10, 000 rpm 离心 2 min, 弃上清。
- 2.加入 10 ml Solution I, 旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀, 呈现出均匀混浊的棕红色。
注意: 菌体沉淀一定要悬浮均匀, 如有未彻底悬浮的菌块会影响裂解, 导致提取的质粒浓度及纯度降低。
- 3.加入 10 ml Solution II, 温和颠倒混匀使菌体完全裂解, 直到溶液变成清亮、粘稠的紫红色。
注意: 不可剧烈震荡, 以免造成基因组 DNA 片段的污染, 所用时间不要超过 5 min, 以免质粒受到破坏, 如未完全变得清亮, 可能是菌体太多, 可增加 Solution II 的用量, 在后续的操作中 Solution N4 的用量也要相应增加。
- 4.加入 10 ml Solution N4, 立即温和颠倒混匀, 可见红黄相间的絮状物产生, 继续混匀直到完全变为黄色。10, 000 rpm 离心 5-10min, 将上清转移至干净离心管 (自备) 中
注意: 1) Solution N4 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀, 如果上清中还有紫色漂浮物, 说明复性不充分, 继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。
2) 离心后在最上层可能会形成一层致密的漂浮膜, 注意不要倒入吸附柱。
(如果实验室离心机采用吊篮式, 不是固定转子, 转速达不到 10000rpm, 可以采用吊篮离心的最大转速 4250g, 离心 10 分钟)
- 5.加入 3 ml 内毒素去除液 Buffer ER, 混匀。。
注意: 如果要得到内毒素更低的质粒, 可将混合液冰浴 10-20 min, 然后 42°C 水浴 5 min, 5000 rpm 离心 3 min, 将上清转移到一新的 50 ml 离心管中 (自备), 最好用 50ml 尖底管, 使油状物集中在狭窄的管底部, 不要吸取下层油状物。
- 6.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。
- 7.将步骤 5 中液体与异丙醇的混合溶液转移到平衡好的吸附柱中 (使用当天用平衡液处理的吸附柱, 放入 50 ml 收集管中), 10, 000rpm 离心 1 min, 弃收集管中的滤液。
注意: 吸附柱的最大容积为 15 ml, 所以上步中所得溶液分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时, 建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 ml, 以防发生漏液现象。
- 8.向吸附柱中加入 5 ml ToxinOut Buffer, 室温静置 5 min, 10, 000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中滤液。
- 9.加入 10 ml Buffer WB2, 室温 10, 000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中滤液。
注意: Buffer WB2 为浓缩液, 按要求加入无水乙醇, 用后应立即盖紧瓶盖, 以防酒精挥发。
- 10.加入 5 ml Buffer WB2, 室温 10, 000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中滤液。
- 11.室温 10, 000 rpm 离心 5 min, 甩干残留液体。
- 12.将离心吸附柱置于一个新的 50 ml 塑料离心管中, 打开管盖, 放置 5 min, 使乙醇彻底挥发干净。
- 13.加入 1-2 ml 洗脱液 Buffer EB, 室温放置 2 min, 10, 000 rpm 离心 2 min, 离心管底溶液即质粒 DNA。
注意: 为增加洗脱效率, 可将得到的质粒溶液重新加入到吸附柱中重复步骤 11 一次, 如需使用去离子水洗脱, 可用 NaOH 调整其 pH 值在 7.0 - 8.5 之间。
【低拷贝或大质粒 (>10 kb) 提取】
低拷贝质粒, 或 >10 kb 的质粒, 或提取农杆菌质粒, 或提取革兰氏阳性菌质粒, 应加大菌体使用量, 使用 300-500 ml 过夜培养物, 最后洗脱液 Buffer EB 60°C 水浴预热, 吸附和洗脱时可以适当延长延长时间, 以增加提取效率。其它步骤相同。

【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。