



KT Endotoxin-Free Mini Plasmid Kit

无内毒素质粒小提中量试剂盒

目录号

MG-TQ-15

产品组成

组分	规格 (50rxns)
RNase A (10 mg/mL)	300 μ L
Buffer BL	30 mL
Buffer P1	30 mL
Buffer P2	30 mL
Buffer P4	30 mL
Endotoxin Removal Buffer	9 mL
Elution Buffer	15 mL
吸附柱 EC(with Collection Tubes)	50 次
Buffer W1	24 mL

保存条件

试剂盒置于常温 (15~30°C) 干燥环境下可保存 15 个月, 单独 RNaseA 包装-20°C保存 2 年, 可常温运输。加入 RNaseA 后的 BufferP1 置于 2~8°C可保存 6 个月。

产品简介

本试剂盒采用改良的碱裂解处理方法及硅胶膜吸附技术, 可特异、高效地获得无内毒素高纯度质粒 DNA; 独特的内毒素沉淀技术, 无需过滤, 操作简便。本试剂盒适用于从 5~15mL 过夜培养的细菌培养物中提取质粒, 所得质粒可直接用于细胞转染、酶切、连接、转化、PCR、测序等分子生物学实验。

产品特点

- ◇ 高纯度: 采用独特的内毒素去除技术, 特异的去除内毒素;
- ◇ 高效转染: 适合包括内毒素敏感细胞在内的绝大多数细胞的转染;
- ◇ 操作简便: 采用吸附柱技术特异吸附质粒, 无需过滤, 操作更为简便;

本产品仅供科研使用



◇ 应用广泛：动植物细胞转染、分子生物学实验均可应用。

适用范围

本品适用于从 5~15mL 细菌培养物中提取高纯度无内毒素的质粒 DNA。

注意事项

1. 细菌培养时间一般为 12~16h，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突变；
2. 每次使用时需观察 BufferP2 和 BufferP4 是否形成沉淀，如有沉淀于 37°C 溶解后使用；
3. 用平衡液处理过的柱子建议立即使用，放置时间过长影响使用效果；
4. 第一次使用前，按照瓶上标签向 BufferW1 中加入 56mL 无水乙醇；
5. Buffer P1 加入 RNase A 后置于 2~8°C 保存；
6. 各溶液使用后请立即盖紧盖子；
7. 所有操作均在室温下进行；
8. 质粒提取得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、质粒的稳定性等因素有关。

使用方法

自备：无水乙醇、异丙醇、2mL 离心管。

1. 柱平衡：向吸附柱中(吸附柱放入收集管中)加入 500 μ L 的平衡液 BufferBL(当天处理)，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 1 min，弃去收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中；
2. 取 5~15mL 过夜培养的菌液，12,000rpm (~13,400 \times g) 离心 1min，弃上清；
3. 加入 500 μ LBUFFERP1 (使用前将试剂盒提供的 RNaseA 全部加入)，旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀；

注意：确保菌体沉淀悬浮均匀，含未悬浮菌块会影响裂解，导致提取质粒的浓度及纯度降低。

4. 加入 500 μ LBUFFERP2，温和颠倒混匀使菌体完全裂解；

注意：不可剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 的污染；所用时间不要超过 5min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，请减少菌体使用量。

5. 加入 500 μ LBUFFER P4，立即温和颠倒混匀，至溶液出现白色絮状物。12,000rpm (~13,400 \times g)离心 10min，使白色沉淀离至管底(可适当增加离心时间)，小心将上清液转移至干净离心管(自备)中(不要带入沉淀)

注意：

- 1) Buffer P4 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀；
 - 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。
6. 加入 150 μ L Endotoxin Removal Buffer，颠倒混匀；

注意：Endotoxin Removal Buffer 可能会出现分层，不影响使用，使用前摇匀即可

本产品仅供科研使用



7. 加入 0.3 倍上述上清液体积的异丙醇，颠倒混匀（加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染）；
8. 将步骤 7 所得混合溶液转移到平衡好的吸附柱 EC(with Collection Tubes, 吸附柱最大容积为 700 μ L, 所得溶液需分次过柱)中，12,000rpm (\sim 13,400 \times g)离心 1min，弃收集管中的滤液；
9. 向吸附柱中加入 600 μ L Buffer W1 (使用前检查是否已加入无水乙醇)，12,000rpm (\sim 13,400 \times g)离心 1min，弃滤液；
10. 重复步骤 9；
11. 将吸附柱 EC 放回空收集管中，12,000rpm (\sim 13,400 \times g)离心 2min；
12. 将吸附柱 EC 置于新的 2mL 离心管中，开盖放置 5min，彻底挥发乙醇；
13. 在吸附膜的中间部位加入 100~300 μ L 洗脱液 Elution Buffer (60~65 $^{\circ}$ C 预热效果更好)，常温放置 2min，12,000 rpm 离心 1min，即得质粒 DNA (如需较多量 DNA, 可将得到的溶液重新转入吸附柱, 重复此步骤)。

常见问题与解决办法

Q1: 质粒 DNA 产量低?

A1:

- 1) 质粒拷贝数低、质粒 > 10kb 或革兰氏阳性菌质粒。应加大菌体使用量, 洗脱液 Elution Buffer 60 $^{\circ}$ C 水浴预热, 吸附和洗脱时间可以适当延长, 以增加提取效率;
- 2) 菌种问题。菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 培养细菌前建议先划线活化, 以稳定产量;
- 3) 细菌未充分裂解。细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬或菌体不宜过多, 避免成团或过量的细菌无法裂解降低产量。

Q2: 质粒 DNA 中有基因组 DNA 污染?

A2:

- 1) 菌液培养时间太长。菌液培养时间需控制在 12~16h;
- 2) 裂解问题。加入 Buffer P2 时, 必须轻柔颠倒混匀; 处理多个样品时, 从加入 Buffer P2 时算起, 总时间不要超过 5min。