

版本号：FDI2127

FinePure EndoFree Plasmid Mini Kit

FinePure 无内毒素质粒小提中量柱式提取试剂盒

(离心柱型)

目录号：D907

产品内容：

产品组成	D907 (50 preps)
RNase A(10 mg/ml)	300 μ l
Buffer BL	30 ml
Buffer P1	30 ml
Buffer P2	30 ml
Buffer P4	30 ml
Buffer DW	30 ml
Buffer DW2	12 ml
Buffer EB	15 ml
DNAPure Spin Columns	50 个
FinePure Filtration Columns	50 个
2 ml Collection Tubes	2 \times 50 个

储存条件：

本试剂盒置于室温（15-25 $^{\circ}$ C）干燥条件下保存 12 个月。低温下 Buffer P2 会有沉淀形成，使用前需在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 min 重新溶解，摇匀后使用。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品简介：

本试剂盒采用SDS和碱裂解法，同时采用特殊的Buffer P4和过滤柱FinePure Filtration Columns，结合玻璃纤维素膜特异性吸附溶液中DNA的方法，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质，适合从5-15 ml细菌培养物中提取质粒DNA。整个提取过程仅需1个小时，方便快捷。纯化的质粒DNA可适用于各种常规操作，包括转染一些常规的传代细胞、酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译等。本试剂盒对Buffer P2进行了优化，可以避免菌量极少时或者菌液过度老化时可能出现的单链质粒DNA，同时对Buffer P4进行了优化，可以有效避免因SDS残留导致的酶切不完全或弥散、转染效率低等情况。

注意事项：

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 试剂盒中提供有 RNase A，简短离心，然后将所有 RNase A 溶液加入 Buffer P1，混匀后置于 2-8℃ 保存。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer DW2 中加入无水乙醇。
3. 所有离心步骤均为使用常规台式离心机室温下进行离心，速度为 12,000 rpm 。
4. 使用前请先检查 Buffer P2 和 Buffer P4 是否出现浑浊，如有混浊现象，可在 37℃ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。注意不要直接接触 Buffer P2 和 Buffer P4，使用后应立即盖紧盖子。
5. 如果提取质粒为低拷贝质粒时，应加大菌体使用量，同时按比例增加 Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer P4 用量，其它步骤相同。

操作步骤：

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 DNAPure Spin Columns 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ l 的 Buffer BL，12,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）
2. 取 5-15 ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，12,000 rpm 离心 1 min，倒弃培养基，然后将离心管在吸水纸上轻轻拍打去尽残液。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μ l Buffer P1/RNase A，使用移液器或涡旋振荡器

彻底悬浮细菌沉淀。

注意：彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。

4. 向离心管中加入 500 μ l Buffer P2，温和地上下颠倒混匀 8-10 次使菌体充分裂解。

注意：轻轻颠倒混匀，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 片断。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过 5 min，以免质粒受到破坏。

5. 向离心管中加入 500 μ l Buffer P4，立即温和地上下颠倒混匀 8-10 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀，室温放置 10 min，然后 12,000 rpm 离心 10 min，此时在离心管底部形成沉淀。

注意：Buffer P4 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

6. 将上一步收集的上清液分次加入过滤柱 FinePure Filtration Columns（过滤柱放入收集管中），12,000 rpm 离心 2 min，然后将滤液转移至干净的 2 ml 离心管中（自备）。

7. 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇（加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染），上下颠倒混匀后转移到吸附柱 DNAPure Spin Columns 中（吸附柱放入收集管中）。

注意：过滤后滤液会损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇。吸附柱的最大容积为 700 μ l，所以需要分次过柱。

8. 12,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 DNAPure Spin Columns 放入收集管中。

9. 向吸附柱 DNAPure Spin Columns 中加入 500 μ l Buffer DW，12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

10. 向吸附柱 DNAPure Spin Columns 中加入 500 μ l Buffer DW2（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 DNAPure Spin Columns 放入收集管中。

11. 重复操作步骤 10 一次。

12. 12,000 rpm 离心 3 分钟。

13. 将吸附柱 DNAPure Spin Columns 置于新的 1.5 ml 离心管中，加入 100-300 μ l Buffer EB（Buffer EB 需在 65-70°C 水浴中预热 3-5 min）至吸附膜的中央，室温放置 1 分钟，

12,000 rpm 离心 1 分钟将质粒溶液收集到离心管中。

注意：如果使用去离子水洗脱，需用 NaOH 将去离子水 pH 调整至 ≥ 7.0 。