



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2025-05-08

无内毒素质粒小提中量提取试剂盒

EndoFree Plasmid Midipure Kit

目录号: ZP122

试剂盒组成	ZP122-1 50次	ZP122-2 100次	ZP122-3 200次
RNaseA (10 mg/ml)	200 μ l	400 μ l	800 μ l
平衡液ZBL	30 ml	60 ml	120 ml
溶液k1	20ml	40ml	80 ml
溶液k2	20ml	40ml	80 ml
溶液E3	20ml	40ml	80 ml
结合液BER	55ml	110 ml	220 ml
漂洗液W2	15 ml	2 $\times$ 15 ml	2 $\times$ 30 ml
洗脱液TER	15 ml	30 ml	30 ml
吸附柱	50 个	100 个	200 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个	200 个
说明书	1 份	1 份	1 份

■ 储存条件

本试剂盒在室温（15-25℃）干燥条件下，可保存1年；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，应在使用前置于37℃下溶解沉淀。单独包装的RNase A 在-20℃可稳定保存1年以上。加入RNase A后的溶液K1应置于2-8℃保存，可稳定保存半年。

实验室使用，仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



■ 产品简介

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，通过离心吸附柱在高盐状态下特异性地结合溶液中的DNA。采用特殊的溶液E3，结合液BER和特制的专用于去除内毒素的DNA吸附柱，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质。从1-15ml大肠杆菌LB (Luria-Bertani) 培养液中，可快速提取多至50 µg高纯度的高拷贝质粒DNA，提取率达85-90 %。

使用本试剂盒内毒素去除操作简便，提取的质粒DNA内毒素含量极低， 可适用于内毒素敏感细胞的转染及各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

■ 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K1在使用前先加入RNaseA（**将试剂盒中提供的RNaseA全部加入**），混匀，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漂洗液W2中加入无水乙醇。
3. 使用前先检查平衡液ZBL、溶液2和溶液4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。
4. 注意不要直接接触溶液K2和溶液E3，结合液BER，用后应立即盖紧盖子。
5. 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心，速度为12,000 rpm (~13,400×g)。
6. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、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k1、k2、E3的用量，洗脱缓冲液应在65-70℃预热。**可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。**

■ 操作步骤

1. **柱平衡处理**: 向吸附柱中加入500 μ l平衡液ZBL, 12,000rpm($\sim$ 13,400 $\times$ g)离心1min, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱重新放回收集管中。(处理过的柱子尽量在1小时内使用, 如果处理时间过长可再次加平衡液ZBL处理)

注: 1、此步骤也可在第5步并行操作离心, 即提取液加入吸附柱前平衡柱子即可。

2、柱平衡可充分激活硅基质膜, 提高得率; 平衡好的吸附柱放置时间超过1小时, 效果将有所下降, 建议再次处理后使用, 但不建议处理2次以上。

2. **收集菌体**: 取菌液1-15ml, 加入离心管中, 12,000 rpm ($\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心1分钟, 收集沉淀。(菌液体积大于离心管, 可以多次离心将菌体收集到一个离心管中)。

注: 为获得高浓度、高得率的质粒, 推荐菌液浓度OD600大于1.5。

3. **重悬菌体**: 向留有菌体沉淀的离心管中加入350 μ l溶液K1 (请先检查是否已加入RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。建议重悬后收集到2ml离心管中。

注意: 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低

4. **裂解菌体**: 向离心管中加入350 μ l溶液K2, 温和地上下翻转3—5次, 室温静置3-5min, 使菌体充分裂解。

注意: 温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免造成所得产物有基因组DNA污染。菌液应变得均一粘稠表明已充分裂解, 如果未变得均一, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应适当减少菌体量。

5. **沉淀除杂**: 向离心管中加入350 μ l溶液E3, 立即温和地上下翻转5-10次, 充分混匀, 即出现白色絮状沉淀, 且沉淀颗粒不大于5mm。12,000 rpm ($\sim$ 13,400 $\times$ g)室温离心5分钟 (离心机温度可调节在20 $^{\circ}$ C以上, 不可以低温), 将沉淀收集在离心管底部。

注意: a、溶液E3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。

b、低温离心时, 可能会出现乳白上清, 可37 $^{\circ}$ C温浴2-3min后重新常温离心沉淀。



6. **上柱吸附**：将上清液转移到一个5ml管中，**加入等体积的结合液BER**，混匀后转移到吸附柱（单次加入量不超过750ul），室温12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心5-10s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中（将5ml管中的液体全部上柱），建议最后一次离心30s。
 7. **漂洗**：向吸附柱中加入600ul漂洗液W2（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心10s，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。重复此步骤一次。
 8. **空离**：将吸附柱放入收集管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。
 9. **洗脱**：将吸附柱置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间滴加50-100 μ l洗脱缓冲液TER（无内毒素的TE缓冲液），室温放置1min，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心1分钟将质粒溶液收集到离心管中。为获得高浓度的质粒，务必采用二次洗脱，将洗脱下来的产物液，再次加回到柱子中洗脱，即重复步骤9。
- 注意**：洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用无内毒素的水做洗脱液，应保证其pH值在7.5-8.5范围内(可以用NaOH将水的pH值调到此范围)，pH值低于7.0会降低洗脱效率。洗脱缓冲液体积不应少于60 μ l，体积过小影响回收效率。且DNA产物应保存在 -20°C ，以防DNA降解。

质粒DNA浓度及纯度检测

得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。电泳可能为单一条带，也可能为2到3条DNA条带，这主要与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。OD₂₆₀值为1相当于大约50 $\mu\text{g/ml}$ 双链DNA。

OD₂₆₀/OD₂₈₀比值应为1.7-1.9，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用去离子水，比值会偏低，但并不表示纯度低，因为pH值和离子存在会影响光吸收值。