



版本号：2310

# GenePrep Endo toxin Plasmid DNA kit

## GenePrep无内毒素质粒小量试剂盒

(离心柱式)

目录号：GNP-04-50

### 产品内容

组分	GNP-04-50	备注
制备次数	50 次	/
吸附柱CP2	50	吸附柱
2 ml 离心管	50	处理管
1.5 ml 离心管	100	收集管
RNase A (50 mg/ml)	30 $\mu$ l	/
Buffer P1	15 ml	悬浮液
Buffer P2	15 ml	裂解液
Buffer P3	21 ml	中和液
Buffer W1	30 ml	去蛋白洗涤液
Buffer W2	24 ml	去盐液
ET-free water (70% ethanol)	18 ml	漂洗液, 使用前加入乙醇
Eluent A	12 ml	洗脱液
Buffer ETR	9 ml	内毒素去除液
Buffer P4	2.5 ml	分相缓冲液
说明书	1	/

### 储存条件

该试剂盒置于室温（15-30°C）干燥条件下，可保存18个月。

## 产品简介

本试剂盒采用SDS碱裂解法，结合DNA吸附柱选择性吸附DNA。同时采用特殊溶液（Buffer ETR和 Buffer P4）有效去除内毒素，可从1-4 mL细菌培养物中提取出多至20 µg高纯度质粒DNA，其内毒素水平控制在0.1 EU/µg 以下。

## 注意事项 请在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- 1.使用前将试剂盒中的RNase A全部加入到悬浮液Buffer P1中，混匀，置于2~8°C储存。
- 2.使用前请先在漂洗液Buffer W2中加入无水乙醇，加入体积请参照试剂瓶上的标识。
- 3.使用前请先在ET-free water 中加入无水乙醇，加入体积请参照试剂瓶上的标识。
- 4.使用前，检查Buffer P2是否出现沉淀，应于37°C水浴中加热溶解后再使用。
- 5.Buffer ETR使用前放到4°C预冷。

## 操作步骤

- 1.取1-4 ml在LB培养基中培养过夜的菌液（若使用丰富培养基，菌液体积应减半或更少），12,000×g 离心1 min，弃尽上清。
- 2.加250 µl Buffer P1（**请先检查是否已加入RNase A**）悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块。
- 3.加入250 µl Buffer P2，温和并充分地上下翻转6-8次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。此步骤不宜超过5 min。

**注意：避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。此步骤不宜超过 5 min，以免质粒受到破坏。Buffer P2 使用后立即盖紧瓶盖，以免空气中CO<sub>2</sub>中和 Buffer P2 中的 NaOH，降低溶菌效率。**

- 4.加350 µl Buffer P3，温和并充分地上下翻转混合6-8次，12,000×g 离心10 min。

**注意：避免剧烈摇晃，否则将导致基因组 DNA 的污染。**

- 5.吸取步骤 4 中的离心上清并转移到吸附柱（置于 2 ml 离心管）中，12,000×g离心 1 min，弃滤液。

6. 将吸附柱置回2 ml 离心管，加 500  $\mu$ l 蛋白洗涤液Buffer W1，12,000 $\times$ g 离心 1 min，弃滤液。
  7. 将吸附柱置回2ml离心管，加 700  $\mu$ l 漂洗液Buffer W2（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 $\times$ g 离心 1 min，弃滤液。
  8. 重复操作步骤7。
- 注意：两次使用Buffer W2 冲洗能确保盐份被完全清除，消除对酶切反应的影响。**
9. 将吸附柱置回 2 ml 离心管中，12,000 $\times$ g 离心 1 min。
  10. 将吸附柱移入新的 1.5 ml 离心管中，在吸附柱膜中央加 150  $\mu$ l Eluent A，室温静置 1 min。12,000 $\times$ g 离心 1 min。
  11. 弃吸附柱，在滤液中加入150  $\mu$ l 预冷的Buffer ETR，剧烈混合1 min。
- 注意：如果Buffer ETR浑浊，于冰上静置，直至溶液变得清亮；如果出现分层，则需混合均匀后使用。**
12. 加入38  $\mu$ l Buffer P4，混合均匀后于42  $^{\circ}$ C 孵育 2 min。12,000 $\times$ g 离心 2 min。
- 注意：孵育后溶液为浑浊。
13. 取上相（透明）至1.5 ml离心管中，加入0.8倍体积异丙醇（如：取得350  $\mu$ l 无色上相，则加入280  $\mu$ l 异丙醇），混合均匀。室温静置10 min。12,000 $\times$ g离心10 min。
  14. 弃尽上清。加入1 ml 预冷的 ET-free water（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 $\times$ g 离心 5 min。
  15. 尽可能弃尽上清。在超净台中干燥5-10 min。
- 注意：管壁上残留液体可短暂离心后吸弃。
16. 加入30~50  $\mu$ l Eluent A溶解质粒DNA。