

无内毒素质粒大量快速提取试剂盒

EndoFree Plasmid Maxi Kit

说明书

产品型号：A19PT713

品牌：RD Land

试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存条件	10 次 (A19PT713) 规格
RNase A (10mg/ml)	4°C	750 µl
溶液 P1	4°C	77 ml
溶液 P2	室温	77 ml
溶液 N3	室温	77 ml
内毒素清除剂	4°C	25 ml
去蛋白液 PE	室温	64 ml  第一次使用前，请按照瓶身标签要求补加无水乙醇
漂洗液 WB	室温	50 ml  第一次使用前，请按照瓶身标签要求补加无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
吸附柱 DC	室温	10 个
收集管 (50ml)	室温	10 个

试剂盒室温条件下储存，有效期 12 个月，不影响实验使用效果。

内毒素清除剂可常温运输，4°C 条件下可稳定保存 12 个月。

储存事项

1. RNase A 溶解于即用型甘油缓冲体系，支持常温运输；收到试剂盒后，环境温度不高于 25°C 可存放至少 6 个月，4°C 保存有效期 12 个月，长期保存建议放置 -20°C。

2. 首次使用试剂盒，将全部试剂盒自带 RNase A 加入溶液 P1 中，配制成终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液，混匀后 4°C 可保存约 3 个月。若 P1 体系内 RNase A 发生失活，提取产物会出现 RNA 残留，可向溶液 P1 中补加 RNase A 继续使用。

3. 环境温度较低时，溶液 P2 内部 SDS 容易析出，出现浑浊、白色沉淀现象；可置于 37°C 水浴加热数分钟，待体系恢复澄清后充分混匀，禁止剧烈摇晃，避免产生大量泡沫。

产品介绍

本试剂盒采用高产 SDS-碱裂解配方完成菌体裂解，质粒产出相比普通试剂盒提升 1-2 倍。结合改良碱裂解法与硅胶膜特异性质粒吸附技术，配套专属试剂体系去除蛋白、核酸杂质，搭配专用内毒素清除剂，最大限度去除样本内毒素。所得质粒可用于普通 PCR、限制性酶切、测序、菌种转化，也可直接用于原生质体处理、真核细胞转染等对毒素敏感的下游实验。

产品特点

1. 吸附柱 DC 采用特制硅基质吸附膜，柱间吸附容量差异小，实验重复性优异，规避普通国产试剂盒膜性能波动问题。
2. 专属去蛋白液配方，高效去除残留核酸酶；针对 JM 系列、HB101 等高核酸酶表达菌株，也可充分消除核酸酶，保护质粒 DNA 不被降解。
3. 全程无需苯酚、氯仿等有毒有机溶剂，无需乙醇沉淀步骤，操作简便快速。从 150-300 mL 大肠杆菌 LB 培养物中，可获取 0.5-2 mg 高拷贝质粒 DNA，提取回收率 80-90%。
4. 特殊配方去除内毒素，DNA 内毒素含量 $< 0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$ ，转染表现优异；产物兼容酶切、转化、PCR、体外转录、测序等各类分子生物学实验。

注意事项

1. 若无特殊说明，全部离心操作均在室温条件开展；适配带 50 mL 转子的台式离心机，离心转速最高 $8000 \times g$ （约 9000 rpm）。
2. 质粒最终得率受菌体培养浓度、质粒拷贝数等因素影响。低拷贝质粒或者 $> 10 \text{ kb}$ 大质粒提取：需要增加菌体起始量，同步按比例放大 P1、P2、N3 试剂用量；洗脱缓冲液 EB 提前 70°C 预热；适当延长吸附、洗脱作用时间，提升提取效率。
3. 质粒 DNA 的浓度、纯度可以通过紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳检测。 $\text{OD}_{260}=1$ 对应 DNA 浓度约 50 $\mu\text{g/mL}$ ；电泳条带可表现为单条、两条或者多条，来源于质粒不同超螺旋构象，和菌体培养时长、提取操作剧烈程度相关；规范操作条件下超螺旋质粒占比可高于 90%。
4. 环状 / 超螺旋质粒电泳迁移速率不固定，无法直接通过电泳判断质粒真实分子量；必须经过酶切线性化，与 DNA 分子量 Marker 比对，才可确定质粒真实大小。

操作步骤（实验前完整阅读全部注意事项）

⚠ 实验前置准备：

- ①漂洗液 WB、去蛋白液 PE，首次使用务必按瓶标签添加无水乙醇，混匀后做好标记，防止重

复加乙醇；

②将试剂盒全部 RNase A 加入溶液 P1，充分混匀，每次使用结束后 2-8℃ 保存。

1. 取 150-200 mL（最大不超过 300 mL）过夜培养大肠杆菌菌液，分装至 50 mL 离心管，8 000 × g 离心 1 min，充分倾倒弃除上清，收集菌体沉淀。

提示：50 mL 离心管容量有限，可以离心倒掉上清后，同一管继续补加菌液，重复本步骤，收集足量菌体。

2. 加入 7.5 mL 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器反复吹打或者涡旋振荡，菌体必须完全打散悬浮。

提示：菌体沉淀分散不完全，会造成裂解不完全，直接降低质粒得率与纯度。

3. 加入 7.5 mL 溶液 P2，轻柔颠倒混匀 6-8 次，充分裂解菌体，室温静置 4-5 min。

⚠️要点：轻柔混匀，严禁剧烈震荡，防止基因组 DNA 断裂；裂解总时间不能超过 5 min，避免质粒损伤；正常裂解后菌液清亮粘稠；体系依旧浑浊代表菌体过载、裂解不充分，需要减少菌体量。

4. 加入 7.5 mL 溶液 N3，立刻轻柔颠倒混匀 6-8 次，体系出现白色絮状沉淀；8 000 × g 离心 10 min，小心吸取上清转移至新离心管，尽量不要吸取漂浮白色沉淀。

提示：N3 加入后要立刻混匀，避免 SDS 局部析出；若表层漂浮大量沉淀，吸头避开浮沫，吸取下层液相；少量微小沉淀随上清进入后续流程不会干扰实验，会在漂洗过滤步骤去除。

5. 向下一步收集得到的上清，加入 0.1 倍体积（上清体积的 10%，约 2.4 mL）内毒素清除剂，颠倒充分混匀。

6. 向混合液加入 0.5 倍体积异丙醇（约 11 mL），颠倒混匀；分多次把混合液转移至吸附柱 DC，8 000 × g 离心 1 min，弃除流出滤液。

提示：转子倾角较大的离心机，单次上柱溶液体积控制 ≤ 10 mL，防止液体溢出漏液，全部样品过完吸附柱为止。

7. 【可选步骤】加入 10 mL 已经补加无水乙醇的去蛋白液 PE，8 000 × g 离心 1 min，弃滤液。

说明：本步骤去除残留核酸酶。XL-1 Blue、Top10、DH5α 等 endA 缺陷菌株核酸酶含量低，可省略；JM 系列、HB101 以及野生菌株，核酸酶丰富，必须执行本步，避免质粒降解、酶切异常。

8. 加入 10 mL 漂洗液 WB（确认已补无水乙醇），8 000 × g 离心 1 min，弃滤液；重复一次该漂洗操作。

9. 吸附柱 DC 放回原收集管，8 000 × g 离心 3 min，彻底烘干硅膜残留乙醇。

⚠️要点：乙醇残留会抑制下游酶切、转染反应，同时降低洗脱回收效率，务必充分除尽乙醇。

10. 将吸附柱转移至全新 50 mL 离心管；室温敞口晾干 2-3 min；向吸附膜正中央悬空滴加 1-2 mL 洗脱缓冲液 EB（EB 提前 65-75℃ 水浴预热，提高回收产量），室温静置 2 min；8 000 × g 离心

1 min, 丢弃吸附柱, 收集质粒 DNA 溶液。

优化建议: 为进一步提高回收率, 将收集得到的质粒溶液重新滴回吸附柱膜, 室温静置 1 min, 8 000 × g 离心 1 min 二次洗脱, 可提升约 10% 回收量。

提示: 洗脱体积越大整体洗脱效率越高; 想要高浓度质粒, 可缩小洗脱体积, 但最低洗脱体积不可小于 0.8 mL, 过小体积会显著降低质粒得率。

附录: 增强型内毒素清除步骤

适用场景: 原代细胞、难转染敏感细胞系, 需要进一步降低内毒素水平, 获取最优转染效果。

承接主流程步骤 5 (加入 0.1 倍体积内毒素清除剂混匀后的上清):

1. 将混合样本冰浴 (或放置冷冻室) 5 min, 体系由浑浊转变为清亮透明 (允许轻微浑浊), 期间颠倒混匀 1 次。

提示: 加入内毒素清除剂后短暂浑浊属于正常现象, 冰浴处理后恢复清亮或微浑。

2. 室温放置 3- 5 min, 待温度回升至室温, 溶液重新变浑浊, 颠倒混匀; 环境温度偏低时, 可 37- 42°C 水浴加速变浑浊, 颠倒混匀。

3. 室温条件, 8 000 × g 离心 10 min 完成两相分层; 上层水相含有质粒 DNA, 下层蓝色油相富含内毒素与杂质。小心吸取上层水相转移至新离心管, 弃下层油状相。

提示: 上清轻微泛淡蓝色、少量误吸入下层油相, 不会干扰后续实验。

4. 获取的上清加入 0.5 倍体积异丙醇 (约 11 mL) 颠倒混匀, 之后接续主流程步骤 6, 上吸附柱 DC, 完成剩余全部操作。