

无内毒素质粒大量快速提取试剂盒

说明书

产品型号：AP13L

品牌：RDLand

一、产品组成

试剂盒组成	保存条件	10 次装 – AP13L01
RNase A (10 mg/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 ⚠ 第一次使用前按说明加指定量无水乙醇
漂洗液 WB	室温	50 ml ⚠ 第一次使用前按说明加指定量无水乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20 ml
Fisherbrand 吸附柱 DC	室温	10 个
50 ml Fisherbrand 收集管	室温	10 个

试剂盒室温储存 12 个月性能稳定；内毒素清除剂常温运输，4°C 保存 12 个月，长期- 20°C 保存。

储存事项

1. RNase A 为即用型甘油缓冲液；常温运输；≤25°C 室温可保存 6 个月，4°C 保存 12 个月，长期分装- 20°C 保存。

2. 首次使用将全部 RNase A 加入溶液 P1（终浓度 100 $\mu\text{g/ml}$ ），混匀后 4℃可保存约 3 个月；若电泳出现 RNA 污染，可补加 RNase A。
3. 低温条件下 P2 中 SDS 会析出浑浊沉淀；37℃水浴数分钟复溶澄清，轻柔混匀，禁止剧烈震荡产生大量泡沫。

产品介绍

Fisherbrand 无内毒素质粒大量快速提取试剂盒采用改进 SDS- 碱裂解法裂解菌体；内毒素清除剂选择性去除内毒素；硅胶基质吸附柱在高盐低 pH 特异性结合质粒 DNA；漂洗液去除蛋白、盐类杂质；低盐高 pH 的 EB 缓冲液洗脱获得高纯质粒 DNA。

产品特点

1. Fisherbrand 特制硅基质吸附膜，柱间吸附量差异极小，重复性优异。
2. 无需苯酚、氯仿等有毒试剂，无需乙醇沉淀；处理 150- 300 mL 大肠杆菌 LB 菌液，可得 0.5- 2 mg 高拷贝质粒 DNA，提取率 80- 90%。
3. 内毒素 < 0.1 EU/ μg DNA，适合细胞转染；同时适配酶切、转化、PCR、体外转录、测序等分子实验。

注意事项

1. 无特殊说明，全部离心为室温操作，离心机需支持 8 000 $\times g$ （约 9 000 rpm），适配 50 mL 转头。
2. 质粒产量受菌液浓度、拷贝数影响；低拷贝质粒或 > 10 kb 大质粒，需要加大菌体，按比例增加 P1/P2/N3 用量；EB 洗脱缓冲液建议 70℃预热，适当延长吸附、洗脱时间提升效率。
3. 纯度检测： $\text{OD}_{260}=1$ 对应 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA；电泳出现多条带为质粒不同超螺旋构象，属正常现象；规范操作超螺旋占比 > 90%。
4. 超螺旋环状质粒电泳不能判定真实分子量；必须酶切线性化后与 Marker 比对才可以确定质粒大小。

操作步骤（实验前请阅读全部注意事项）

✓预处理：漂洗液 WB、去蛋白液 PE 首次使用前加入指定体积无水乙醇，混匀并标记，避免重复添加；

✓将试剂盒全部 RNase A 加入溶液 P1 混匀，每次使用后 2- 8℃保存。

1. **收集菌体**：取 150- 200 mL（最大不超过 300 mL）过夜 LB 菌液，分装至 50 mL 离心管，8 000 $\times g$ 离心 1 min，彻底倒净上清；同一管可多次补加菌液重复离心收集菌体。

▲菌体沉淀收集不全会降低质粒得率。

2. **重悬**：加入 7.5 mL 溶液 P1，吹打或涡旋至菌体完全悬浮，无肉眼可见菌块。

▲残留菌块会裂解不完全，产量、纯度下降。

3. **裂解**：加入 7.5 mL 溶液 P2，温和颠倒 6-8 次充分裂解，室温放置 4-5 min。

>

▲轻柔混匀，禁止剧烈震荡，防止基因组 DNA 断裂；裂解时间不可超过 5 min；溶液应清亮粘稠，若持续浑浊代表菌体过量，需减少菌体量。

4. **中和沉淀**：加入 7.5 mL 溶液 N3，立即温和颠倒 6-8 次混匀，出现白色絮状沉淀；8 000 × g 离心 10 min，小心吸取上清，尽量不要吸到表层白色漂浮沉淀。

▲N3 加入后立即混匀，防止 SDS 局部析出；少量沉淀误吸入不影响结果，后续漂洗步骤去除。

5. **初步去除内毒素**：向上清加入 0.1 倍体积（约 2.4 mL）内毒素清除剂，颠倒充分混匀。

6. **质粒结合上柱**：加入 0.5 倍体积异丙醇（约 11 mL）颠倒混匀；分次上样至 Fisherbrand DC 吸附柱，单次上样不超过 10 mL 防止漏液；8 000 × g 离心 1 min，弃滤液，直至全部液体过柱。

7. **去蛋白洗涤**：加入 10 mL 去蛋白液 PE（确认已加无水乙醇），8 000 × g 离心 1 min，弃滤液。

8. **漂洗除盐**：加入 10 mL 漂洗液 WB（确认已加无水乙醇），8 000 × g 离心 1 min，弃滤液；重复一次漂洗。

9. **彻底去除乙醇残留**：空吸附柱放回收集管，8 000 × g 离心 3 min，干燥硅胶膜去除乙醇残留。

▲乙醇残留会抑制下游酶切、转染，降低质粒产量。

10. **质粒洗脱**：吸附柱转移至全新 50 mL 离心管；室温晾干 2- 3 min；向吸附膜中央滴加 1-2 mL 洗脱缓冲液 EB；EB 提前 65-75 °C 水浴预热提升回收率；室温静置 2 min，8 000 × g 离心 1 min 收集质粒。

🔗**增效**：洗脱得到的质粒溶液重新滴回吸附膜，静置 1 min，8 000 × g 离心 1 min，回收率提升约 10%。

⚠最小洗脱体积不得低于 0.8 mL；洗脱体积越小浓度越高，但总产出下降。

附录：增强型内毒素清除步骤（原代 / 难转染细胞推荐）

在标准步骤 5 完成后执行，适合原代细胞、干细胞、转染效果差的细胞系。

1. 加入 0.1 倍体积内毒素清除剂混匀后，冰浴 / 冷冻室 5 min，期间颠倒混匀 1 次；体系由浑浊变为清亮（轻微浑浊可接受）。

2. 室温放置 3-5 min，溶液重新变浑浊；环境温度低可 37-42 °C 水浴加速分层，颠倒混匀。

3. 室温 8 000 × g 离心 10 min 分相；上层水相含质粒 DNA，下层蓝色油相富集内毒素杂质；小心吸取上层水相转移至新离心管，严禁吸取底层蓝色油状物。

4. 水相中加入 0.5 倍体积异丙醇（约 11 mL）颠倒混匀，回到标准操作步骤 6 继续完成全部提取。