



无内毒素质粒小提中量试剂盒说明书

货号：WGD-X-3100004

产品介绍

本试剂盒对传统的碱裂解法进行了优化，并采用先进的硅胶膜吸附技术，在短时间内高效、特异地吸附质粒 DNA。同时采用中和液 MP3 和过滤柱 ES 可以有效的去除内毒素、蛋白质、多糖等杂质。以下操作步骤适用于提取 5 ~ 15 mL 过夜培养的大肠杆菌。本试剂盒采用特制的内毒素去除试剂，得到的质粒 DNA 纯度高，内毒素含量极低，适用于酶切、PCR、连接、测序、转染等一系列常规生物学实验。

产品目录

产品名称	规格
无内毒素质粒小提中量试剂盒	50 rxns
无内毒素质粒小提中量试剂盒	200 rxns

产品组成

组分/含量	50 rxns	200 rxns
平衡液 BL	30 mL	120 mL
重悬液 P1	30 mL	120 mL
裂解液 P2	30 mL	120 mL
中和液 MP3	30 mL	120 mL
去蛋白液 PD	60 mL	240 mL
漂洗液 PW	15 mL	50 mL
洗脱液 EB	15 mL	60 mL
RNase A（10 mg/mL）	300 µL	1.25 mL
过滤柱 ES	50 个	200 个
吸附柱 E10	50 个	200 个
收集管	100 个	200 个×2

产品用途

用于 5 ~ 15 mL 菌液质粒提取，尤其是对内毒素限度有要求的质粒提取。

产品特点

操作简单，耗时短，质粒得率高，质粒纯度高，内毒素含量低。

注意事项

- 重悬液 P1 在使用前需加入 RNase A（10 mg/mL），混匀，加入后打√，置于 2 ~ 8℃保存。
- 首次使用前请按漂洗液 PW 瓶身标签所示，加入无水乙醇，混匀，加入后打√，室温保存。
- 使用前请先检查各组分尤其是裂解液 P2 是否出现析出，如有析出，可 37℃条件下温浴至溶液澄清，混匀后再使用。



4. 注意不要直接用手接触裂解液 P2、中和液 MP3 和去蛋白液 PD，使用时应戴手套，使用后应立即盖紧盖子。
5. 提取的质粒得率和质量与宿主菌的种类、质粒拷贝数、稳定性等因素有关。
6. 操作过程中需要自备数个干净无内毒素的 2 mL 离心管，无水乙醇，异丙醇。
7. 实验前使用平衡液处理吸附柱，可以充分激活硅胶膜，提高得率；处理后的柱最好当天使用，放置时间过长会影响效果。
8. 各步骤的离心力和时间为参考，可结合自身离心机条件调整合适的离心力或转速、时间。

■ 操作步骤

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 E10 中（吸附柱 E10 放入收集管中）加入 500 μ L 的平衡液 BL，12000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，吸附柱重新放回收集管中。（吸附柱 E10 当天处理当天使用）

2. 取 5~15 mL 大肠杆菌菌液，加入离心管（自备）中，12000 $\times$ g 离心 1 min，尽量吸除上清。

注意：可几次离心将菌体沉淀离心收集到一个 2 mL 离心管中；有条件可以使用大离心管一次离心完成，并继续在其中完成 2~4 步。过多的菌体裂解不充分会降低质粒的提取效率，菌体量以能够充分裂解为佳。

3. 向留有菌体沉淀的离心管内加入 500 μ L 重悬液 P1（检查是否已加入 RNase A），使用移液枪或涡旋振荡器彻底悬浮菌体沉淀。

注意：彻底重悬菌体沉淀很关键，应看不到菌体团块，否则会影响裂解过程，导致产量和纯度降低。

4. 向离心管中加入 500 μ L 裂解液 P2，温和地上下翻转 6~8 次，使菌体充分裂解。

注意：此步骤应温和地混匀，剧烈振荡或涡旋会引起基因组 DNA 断裂，造成污染。总时间不得超过 5 min，避免质粒被破坏。反应后菌液应变得清亮粘稠，表明细菌裂解充分。此步骤会受不同菌液本身的影响，若菌液未变清亮，可能由于菌体过多导致裂解不彻底，可减少菌液量。

5. 向离心管中加入 500 μ L 中和液 MP3，加入后立即温和地上下翻转混匀 8~10 次，充分混匀，此时出现白色絮状沉淀，然后室温放置 10 min，12000 $\times$ g 离心 10 min。

注意：加入中和液 MP3 后应立即混匀，避免产生局部沉淀。

6. 将上一步的上清液分次加入过滤柱 ES（过滤柱 ES 放入收集管中），12000 $\times$ g 离心 2 min，滤液收集到干净的 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，上下颠倒混匀后转移到吸附柱 E10 中（吸附柱 E10 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，异丙醇加入量过多容易导致 RNA 污染；吸附柱 E10 最大容积为 700 μ L，需要分开上柱。

8. 12000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 E10 重新放回收集管中。

注意：将操作步骤 7 所得溶液分次过柱，每次均按以上条件操作。

9. 向吸附柱 E10 中加入 500 μ L 去蛋白液 PD，12000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，把吸附柱 E10 重新放回收集管中。

注意：提取低拷贝质粒时建议重复操作步骤 9，以充分去除杂质。

10. 向吸附柱 E10 中加入 600 μ L 漂洗液 PW（请检查是否已加入无水乙醇），12000 $\times$ g 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，把吸附柱 E10 重新放回收集管中。

注意：加入漂洗液 PW 后，可以室温静置 2 min，有利于更好的去除杂质。

11. 重复操作步骤 10。

12. 将吸附柱 E10 重新放入收集管中，12000 $\times$ g 离心 2 min，彻底去除吸附柱 E10 中残留的漂洗液。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应实验。建议在下一步洗脱前，先将吸附柱 E10 开盖，室温静置 2 min 以上，以彻底晾干吸附材料中残余的乙醇。

13. 将吸附柱 E10 置于干净无内毒素离心管中，向吸附柱 E10 膜的中间位置悬空滴加 50~300 μ L 的洗脱液 EB，室温静置 2 min，12000 $\times$ g 离心 1 min 洗脱质粒，提取的质粒 DNA 于 -25~-15 $^{\circ}$ C 保存。

注意：想要得到高浓度的质粒可以适当减少洗脱体积，但洗脱液体积小影响回收效率。若需获得最高产量，将洗脱液 EB 预热至 55 $^{\circ}$ C 提高洗脱效率，此外可将离心液重新加入到吸附柱 E10 中，室温静置 2 min，再次 12000 $\times$ g 离心 30 sec。



■ 储存及运输条件

室温（15~30℃）条件下可保存 12 个月。加入 RNase A（10 mg/mL）和指示剂的重悬液 P1 应置于 2~8℃保存，可稳定保存 6 个月。常温（15~30℃）运输。

■ 常见问题及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
质粒产率低	菌液量不够。	增加菌液用量。
	菌液浓度不够。	延长摇菌时间。
	宿主菌老化。	缩短摇菌时间； 选择活性高的宿主菌。
	质粒拷贝低。	更换为高拷贝质粒。
	宿主菌不适合。	选择合适的宿主菌。
	漂洗液未加乙醇。	按照要求添加乙醇。
	裂解不充分。	按照说明书要求逐步操作； 减少菌体用量。
	洗脱不充分。	将洗脱液加热至 55℃； 确保洗脱液滴加到吸附柱 E10 膜中央；延长洗脱放置时间。
质粒纯度低	RNA 残留。	确保重悬液 P1 置于 2~8℃保存； 减少菌体用量。 增加一次去蛋白液 PD 的洗涤次数。
	基因组 DNA 残留。	加入裂解液 P2 后，避免剧烈震荡； 缩短裂解液 P2 裂解时间。
	盐离子残留。	加入漂洗液后，颠倒混匀 2~3 次； 添加漂洗液后，延长静置时间。