



无内毒素质粒大量提取试剂盒说明书

货号：WGD-X-3100005

产品介绍

本试剂盒适用于 100 ~ 200 mL 菌液的质粒 DNA 提取，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，可有效地除去蛋白质、多糖和其它非核酸类物质。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，内毒素水平极低，提取产物适用于酶切、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
无内毒素质粒大量提取试剂盒	10 rxns

产品组成

组分	10 rxns
平衡液 BL	60 mL
重悬液 P1	120 mL
裂解液 P2	120 mL
中和液 AP3	120 mL
去内毒素液 P4	60 mL
漂洗液 PW	50 mL
洗脱液 EB	60 mL
RNase A（10 mg/mL）	1.25 mL
吸附柱 A14（含收集管）	10 套
收集管	10 个

产品用途

用于 100 ~ 200 mL 菌液低拷贝或高拷贝质粒提取，尤其是对内毒素限度有要求的质粒提取。

产品特点

耗时短，质粒得率高，纯度高，内毒素含量极低。

注意事项

1. 重悬液 P1 在使用前需加入 RNase A（10 mg/mL）（将试剂盒内提供的 RNase A（10 mg/mL）全部加入，可以适当润洗，加入后打√），混匀，于 2 ~ 8 °C 保存。
2. 首次使用前请按漂洗液 PW 瓶身标签所示，加入对应量的无水乙醇，混匀，加入后打√，室温保存。
3. 使用前请先检查裂解液 P2、中和液 AP3 是否出现浑浊，如有浑浊现象，可在 37°C 条件下温浴至溶液澄清，混匀后再使用。
4. 注意不要直接接触裂解液 P2、中和液 AP3 和去内毒素液 P4，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热原的 50 mL 离心管，无水乙醇，异丙醇。

■ 操作步骤

1. 可选柱平衡步骤。吸附柱放置后受环境影响可能会降低其性能，需要平衡液活化。在吸附柱膜上加入 3 mL 平衡液 BL，9000 ×g 离心 2 min 待用，活化后的柱子尽快使用，现用现活化，不可久放。

注意：建议每次提取时都进行柱平衡步骤。

2. 取 200 mL（100 ~ 200 mL）菌液，分多次加入 50 mL 离心管中，9000 ×g 离心 2 min，尽量吸除上清。

注意：可以通过几次离心将较多的菌体沉淀收集到一个离心管中。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 10 mL 重悬液 P1（检查是否已加入 RNase A（10 mg/mL）），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮菌体沉淀。

注意：彻底重悬菌体沉淀对产量很关键，重悬后应看不到菌体团块，若存在团块，会影响裂解过程，导致产量和纯度降低。如果要提取更多菌液，按比例增加相应试剂的用量。

4. 向离心管中加入 10 mL 裂解液 P2，温和地上下翻转 15 ~ 20 次，使菌体充分裂解，变得清亮，室温放置 5 min。

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。此步骤受不同菌液本身的影响，若菌液未变清亮，可能是菌体量过多导致裂解不彻底，应适当减少菌体量。

5. 向离心管中加入 10 mL 中和液 AP3，立即温和地上下颠倒混匀 15 ~ 20 次，充分混匀，至溶液出现白色分散絮状沉淀，然后室温放置 10 min，9000 ×g 离心 10 min（如菌体量过多，推荐延长离心时间至 20 ~ 30 min）。

6. 将上一步的上清液小心转移到新的离心管中，向上清液中加入 4 mL 去内毒素液 P4，用力颠倒混匀，直至去内毒素液 P4 均匀分散，呈现淡黄色乳浊液。

注意：去内毒素液 P4 黏度较大，建议用移液枪使用“反向移液法（吸二打一）”的方法量取，吸取时确保枪头在液面下保持足够长的时间吸满。

7. 加入上一步溶液体积 0.3 倍的异丙醇，上下颠倒混合均匀，直至溶液呈现匀质透明状态。将液体转移到吸附柱中（将吸附柱置于收集管或 50 mL 离心管中），9000 ×g 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，把吸附柱重新放回收集管中。

注意：吸附柱最大容积为 15 mL，且要注意离心机的倾角，不要加入过多液体，避免离心时液体洒出，分多次过柱吸附。

8. 向吸附柱中加入 10 mL 漂洗液 PW（检查是否已加入无水乙醇），9000 ×g 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，把吸附柱重新放回收集管中。

注意：加入漂洗液后，可以加盖室温静置 2 min，有利于更好的去除杂质。

9. 重复步骤 8。

10. 将吸附柱放回收集管中，加盖 9000 ×g 空离心 5 min，去除吸附柱中残余的漂洗液 PW。将吸附柱开盖，置于室温放置数分钟，彻底晾干膜上残余的乙醇。

11. 将吸附柱置于新的收集管中，在吸附柱膜中央加入 1 ~ 2 mL 洗脱液 EB，室温静置 5 min，9000 ×g 离心 2 min 洗脱 DNA，提取的质粒 DNA 于 -25 ~ -15℃ 保存。

注意：可以适当减少洗脱体积以得到高浓度的质粒，但洗脱液体积小于 1 mL 会降低提取总量。若需获得最高产量，将洗脱液 EB 预热至 55℃，此外将离心液重新加入到吸附柱中，室温静置 5 min，再次 9000 ×g 离心 5 min。

■ 储存及运输条件

室温（15 ~ 30℃）条件下可保存 12 个月。加入 RNase A 的重悬液 P1 应置于 2 ~ 8℃ 保存，可稳定保存 6 个月。

运输条件：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，同时按比例增加 P1、P2、AP3 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。 选择高活性宿主菌。
	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	按照说明书操作及要求，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膜中央。 加入洗脱液 EB 后延长静置时间。
质粒纯度低	RNA 残留	确保 P1 于 2~8℃ 保存。 减少菌体用量。
	基因组 DNA 残留	加 P2 后避免剧烈振荡。 缩短 P2 裂解时间。
	盐离子残留	加入漂洗液后，加盖颠倒混匀 2~3 次。 添加漂洗液后，延长静置时间。