

版本号: V1.0.0/2025

FinePure无内毒素质粒大提试剂盒说明书

【产品名称】通用名称: 质粒大提试剂。

【包装规格】10次。

【预期用途】用于质粒大提。

【检验原理】在碱性条件下, 染色体DNA会变性并形成单链, 而共价闭合环状质粒DNA虽然也会发生部分变性, 但两条互补链仍然保持缠绕状态。当加入酸性盐离子缓冲液后, 质粒DNA迅速复性回到双链结构, 而染色体DNA由于分子量较大且结构复杂, 难以完全复性, 从而形成不溶性网状结构并沉淀下来。通过一系列洗涤和沉淀步骤去除蛋白质、RNA以及其他杂质, 得到高纯度的质粒DNA。

【产品组成】

组分名称	D919 (10 次)
RNase A (10 mg/ml)	1 ml
Buffer BL	30 ml
Buffer P1	100 ml
Buffer P2	100 ml
Buffer P4	100 ml
Buffer DW2	44 ml
Buffer EB	30 ml
吸附柱AFT (含50 ml收集管)	10 个
过滤器GS2	2×5 个
收集管 (50 ml)	10 个

【产品介绍】本试剂盒采用独特的玻璃纤维素膜吸附技术, 高效专一地结合质粒 DNA。同时采用精心优化的 Buffer P4和过滤器 GS2, 可有效的去除内毒素、蛋白等杂质; 整个提取过程仅需1 h, 方便快捷。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、连接、转化和转染多种细胞等实验。

【储存条件及有效期】室温 (15-25℃) 干燥条件下保存, 有效期 1 年。当RNase A加入 Buffer P1后, 可在2-8℃保存6个月。

【样本要求】适用样本类型: 菌液。推荐每次菌液使用量: 高拷贝质粒推荐使用量为100 ml, 得率一般在500-1500 μg左右; 低拷贝质粒推荐使用量为200 ml, 得率一般在200-600 μg



Tel: 15358121379

Web: www.genfine.com

左右。

【检验方法】

使用前请先在Buffer DW2中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 柱平衡步骤：向吸附柱AFT中 (吸附柱放入50 ml收集管中) 加入2.5 ml Buffer BL，8,000 rpm ($\sim 8,228\times g$)离心2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。 (用平衡液处理过的柱子最好立即使用)。
2. 取100 ml (根据培养菌体的浓度选择合适的量，低拷贝推荐用200 ml) 过夜培养的菌液加入离心管，室温8,000 rpm ($\sim 8,228\times g$)离心3 min收集细菌，尽量吸除上清。
注意：菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中，菌液量以能够充分裂解为佳，菌液过多会导致裂解不充分从而降低质粒的提取效率。
3. 尽量吸除上清，为确保上清液全部吸取，请用干净的吸水纸吸去瓶壁上的水滴。
4. 向留有菌体沉淀的离心管中加入8 ml Buffer P1 (请先检查是否已加入 RNase A)，使用涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。
注意：请务必彻底悬浮细菌沉淀，如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解效果，导致提取量和纯度偏低。对于低拷贝质粒，加大菌体用量的同时按比例增加 P1、P2 和 P4 的用量。
5. 向离心管中加入8 ml Buffer P2，立即温和地上下翻转8次，使菌体充分裂解，室温放置5 min。
注意：温和地混匀，每次旋转 180 度后停留 1-2 sec 以使其充分混匀，不要剧烈震荡，以免污染基因组DNA。此时菌液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
6. 向离心管中加入8 ml Buffer P4，立即温和地上下翻转8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左右。8,000 rpm ($\sim 8,228\times g$)离心5 min，将上清小心倒入过滤器GS2中，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的带刻度的50 ml离心管中 (需自备)。
7. 向滤液中加入0.3 倍滤液体积的异丙醇 (加入异丙醇过多容易导致RNA污染)，上下颠倒混匀后转移到吸附柱AFT 中 (吸附柱放入 50 ml 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。建议加入溶液的体积为不超过10 ml(超过该体积可能会导致液体溅出)，对于100 ml 菌体，需要分 3 次过柱。
8. 8,000 rpm ($\sim 8,228\times g$)离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。



注意：对于100 ml菌体，第7步中所得溶液需要分3次过柱，离心均按照步骤8进行。

9. 向吸附柱中加入10 ml Buffer DW2 (**请检查是否已加入无水乙醇**)，8,000 rpm ($\sim 8,228\times g$)离心 2 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
10. 重复操作步骤 9。
11. 8,000 rpm ($\sim 8,228\times g$)离心 5min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。
12. 将吸附柱置于一个干净的50 ml收集管中，向吸附膜中间部位悬空滴加1-2 ml Buffer EB (**Buffer EB需在65-70°C水浴中预热3-5 min**)，室温放置5 min后，8,000 rpm ($\sim 8,228\times g$)离心 2 min。将50 ml离心管中洗脱液全部转入干净的1.5ml离心管中，-20°C保存。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 12。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用ddH₂O做洗脱液应保证其pH值 7.5-8.0 范围内，pH值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量的多少主要是依据质粒的拷贝数以及实验所需要的浓度来确定。建议洗脱缓冲液体积为2 ml，如果需要更高浓度质粒或提取低拷贝质粒，可使用1 ml，体积过小影响回收效率。DNA产物应保存在-20°C，以防降解。

可选步骤 (如果需要更高浓度的质粒，可进行如下操作)

1. 每1 ml洗脱液中，加入1.42 ml 异丙醇以及0.42 ml 5M NaCl (客户自备)，混匀，室温放置5 min，8,000 rpm离心10 min，小心弃上清。
2. 加入0.5 ml 的70%乙醇洗涤沉淀，室温8,000 rpm离心5 min，小心弃乙醇。
3. 重复操作步骤2。
4. 空气中干燥沉淀约5-10 min，根据需要适当用适当体积的Buffer EB溶解沉淀。

质粒DNA浓度及纯度检测

得到的质粒DNA可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度与纯度。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 $\mu\text{g/ml}$ 双链DNA。纯化的质粒DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 通常在 1.7-1.9 左右，可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对DNA 纯度要求很高的实验中。



【产品性能指标】

1. 外观

应符合公司技术要求。

2. 提取效率

应符合公司技术要求。

【注意事项】

1. 在使用前将全部RNase A加入Buffer P1，混匀，置于2-8℃保存。
2. 使用前先检查Buffer P2是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀现象，可在50℃水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 注意皮肤不能直接接触Buffer P2和Buffer P4，使用后应立即盖紧盖子。
4. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10 kb的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加P1、P2和P4的用量；洗脱缓冲液推荐在65-70℃水浴中预热(可以适当延长吸附和洗脱时间，以提高提取效率)。
5. 实验前使用Buffer BL处理吸附柱，可以最大限度激活玻璃纤维素膜，提高得率，处理过的柱子最好立即使用，放置时间过长会影响使用效果。

【标识的解释】

包装所用的图形、符号、缩写等内容的解释：

- 1.防潮 见图1； 2. 向上 见图2； 3. 易碎 见图3；



图1



图2



图3

【基本信息】

生产企业：江苏蓝鲸生物医疗科技有限公司

联系方式：17352992285

生产地址：江苏省南京市六合区惠通创意产业园时代大道96号5号楼2层

【说明书最后修改日期】 2025年06月30日

【生产日期及失效日期】 见标签



Tel: 15358121379

Web: www.genfine.com