

## riboEXTRACT 低内毒素质粒 DNA 小提试剂盒(离心柱法)

## 产品使用说明

RN: R11125.2

## 产品简介

riboEXTRACT 低内毒素质粒 DNA 小提试剂盒(离心柱法)在提取质粒的过程中, 加入了锐博生物自主研发的内毒素去除试剂, 从而有效的去除菌体裂解产生的内毒素, 可从 1~5 mL 大肠杆菌培养液中提取 5~15 ug 低内毒素的质粒。提取的低内毒素质粒, 适用于常规的细胞转染实验, 亦可用于酶切、测序、PCR、转化等分子生物学试验。

## 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	试剂	C11074-1 50T	备注
组分 A	溶液 P1	12.5 mL	第一次使用时加入组分 H (RNase A)
组分 B	溶液 P2	12.5 mL	
组分 C	溶液 P3	17.5 mL	
组分 D	内毒素去除剂 PE	12.5 mL	
组分 E	去蛋白液 PD	25 mL	
组分 F	漂洗液 PW	12 mL	第一次使用时加入 4 倍体积的无水乙醇
组分 G	洗脱液 EB	2.5 mL	
组分 H	RNase A (10 mg/mL)	0.125 mL	
组分 I	吸附柱 NP	50 套	包括吸附柱和离心收集管

## 运输与保存

本品为常温运输, 未开封使用的试剂可于室温 (15~25°C) 干燥条件保存, 可稳定保存 1 年。

组分 A 溶液 P1 在加入【组分 H】RNase A 后, 需于冷藏条件 (2~8°C) 保存, 保存时间为 6 个月。

## 使用前须知

- 1) 本品仅供科研实验使用, 不可用于临床检测或治疗用途。
- 2) 本品适用于大肠杆菌细胞中提取低内毒素质粒, 适用于酶切、连接、PCR、测序、文库筛选等分子生物学实验以及细胞转染。
- 3) 实验时请佩戴一次性手套和口罩等防护用品。
- 4) 第一次使用前需将【组分 H】RNase A 全部加入到【组分 A】溶液 P1 中, 标记上加入日期并储存于 2~8°C, 可稳定储存 6 个月。
- 5) 第一次使用前【组分 F】漂洗液 PW 需加入 4 倍体积的无水乙醇。

- 6) 每次使用后，注意密封好吸附柱的封口袋，以避免污染。
- 7) 质粒提取质量和得率与宿主菌的种类、培养条件、质粒拷贝数、质粒稳定性、细胞裂解方法等因素密切相关，常见质粒的拷贝数类型可参考表 2。
- 8) 本试剂盒含 RNase A，避免同时或同区域进行 RNA 相关实验。

表 2 常见质粒拷贝数类型

拷贝数类型	质粒骨架类型	质粒产量
低拷贝	pBR322, pSC101, pWE15, pACYC, SuperCos 等	每 mL 菌液可得 0.2~1 ug 质粒
高拷贝	pUC, pBluescript, pTZ, pGM 等	每 mL 菌液可得 1~5 ug 质粒

## 实验材料准备

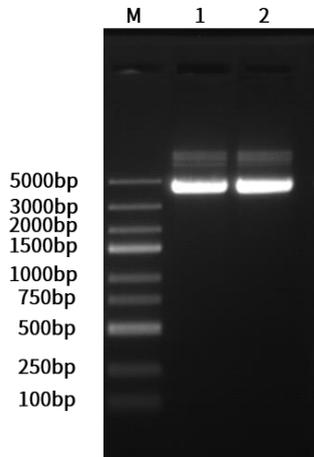
- 1) 无水乙醇
- 2) 异丙醇
- 3) 无内毒素 EP 管
- 4) 台式离心机
- 5) 水浴锅

## 实验方法

步骤	操作内容
1	取 1~5 mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，使用台式离心机，常温 12000 rpm 离心 1~2 分钟，弃去上清，保留菌体沉淀。
2	加入 250 $\mu$ L 溶液 P1 (已添加 RNase A)，吹打或使用涡旋振荡器混匀，确保菌体彻底悬浮。 注：不能有细菌团块，重悬不彻底影响质粒产量及纯度。
3	加入 250 $\mu$ L 溶液 P2，立即轻柔地上下翻转 6~8 次以充分混匀（不可剧烈振荡）。此时溶液呈清澈状，室温静置 2 分钟。 注：不可剧烈振荡并严格控制时间，以免质粒受到破坏或受到基因组 DNA 污染。
4	加入 350 $\mu$ L 溶液 P3，立即轻柔地上下翻转 6~8 次以充分混匀。此时出现絮状不溶物，常温 12000 rpm 离心 5~10 分钟。 注：若离心后上清中仍有白色絮状物，应再次离心。
5	立即小心收集上清液于新 EP 管（避免吸到沉淀），向其中加入 3/10 体积的内毒素去除剂 PE，上下颠倒混匀后，立即放于冰上 10 分钟。
6	冰浴结束后，立即将离心管放于 55°C 水浴锅中水浴 10 分钟，再放入离心机常温 12000 rpm 离心 3 分钟，小心吸取上清，转移到新 EP 管内。 注：离心温度应控制在 25°C 或以上，吸取上清请勿吸到离心管底部的蓝色液体。
7	向管内添加 0.6 倍体积的异丙醇，上下颠倒混匀后转移至提前放入收集管的离心柱中，常温 12000 rpm 离心 1 分钟。重复此步骤至全部上柱。
8 (选做)	吸取收集管中的液体再次加入吸附柱中，常温 12000 rpm 离心 1 分钟，弃收集管内的废液。（可提高提取质粒的浓度）
9	向吸附柱中加入 500 $\mu$ L 去蛋白液 PD，常温 12000 rpm 离心 30 秒，弃收集管中的废液。
10	向吸附柱中加入 600 $\mu$ L 漂洗液 PW (已加 4 倍体积无水乙醇)，12000 rpm 离心 30 秒，弃收集管中的废液。

11	重复 1 次步骤 10。
12	将吸附柱放回收集管内常温 12000 rpm 离心 2 分钟，弃收集管及废液。
13	将吸附柱放入新 EP 管中，开盖室温静置 3~5 分钟。
14	向吸附柱的中央区域加入适量 (30~100 $\mu$ L) 洗脱液 EB (必要时可 55°C 预热)，室温静置 3 分钟后常温 12000 rpm 离心 2 分钟，获得洗脱的质粒溶液。
15 (选做)	将洗脱的质粒溶液立即重新上柱，12000 rpm 离心 2 分钟，回收质粒 DNA。(可以提高质粒浓度。)
16	琼脂糖凝胶电泳及吸光度检测确认质粒浓度和质量，将洗脱的质粒保存于-20°C或直接用于下游实验。

## 提取结果示例



样本编号	浓度 (ug/mL)	内毒素含量 (EU/ug)
#1	279	0.112
#2	313	0.071

图 1 低内毒素质粒提取结果示例。使用 riboEXTRACT 低内毒素质粒 DNA 小提试剂盒(离心柱法)从两份大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中提取 pCE-RB-Mam-EGFP2 质粒

## 相关产品

产品编号	产品名称	规格
C11028-2	riboEXTRACT 通用型 DNA 纯化回收试剂盒（离心柱法）	50 T
C11071-1	riboEXTRACT 总 RNA 提取试剂	50 mL
C11029-1	riboEXTRACT 质粒 DNA 小提试剂盒（离心柱法）	50 T

## FAQ

### 1、 质粒提取的产量低如何解决？

答：建议采用传代次数较低的新鲜菌液进行提取，提取过程建议提高收集菌体的量并按相应比例增加溶液 P1、溶液 P2、溶液 P3 的量进行质粒提取，增加离心固液分离后上清的过柱次数以及增加洗脱次数。在加入溶液 P2 前，确保细胞完全悬浮没有细胞团块，避免裂解不充分。

### 2、 溶液 P2 出现沉淀是否会影响质粒 DNA 的提取？

答：溶液 P2 中含有 SDS 成分，在储存温度较低的情况下可能会出现沉淀，若出现沉淀，可在 37°C 条件下加热至液体恢复澄清，不会影响质粒提取的效果。

### 3、 为什么提取的质粒 DNA 存在基因组 DNA 污染？

答：加入溶液 P2 后轻柔振荡，且裂解时间不超过 5 分钟，不可剧烈振荡。菌体培养时间避免超过 16 小时。

### 4、 为什么提取的质粒 DNA 存在 RNA 污染？

答：检查溶液 P1 中是否已加入 RNase A，并且在 2~8°C 中保存不超过 6 个月。

### 5、 riboEXTRACT 质粒 DNA 小提试剂盒（离心柱法）和 riboEXTRACT 低内毒素质粒 DNA 小提试剂盒（离心柱法）有何区别？

答：内毒素可以影响细胞生长、蛋白质的表达以及降低转染效率，所以应用于细胞转染实验的质粒，需要使用 riboEXTRACT 低内毒素质粒 DNA 小提试剂盒（离心柱法）提取以控制内毒素的含量，而对于常规分子生物实验，如测序、PCR、转化等实验，则两个试剂盒提取的质粒均可以。