

**AipFast Plus 无内毒素高纯度快速质粒大提试剂盒(离心柱型)**  
AipFast Plus Endo-Free High-Pure Rapid Plasmid Maxi Kit(Centrifugal Column)

**使用说明书**

◆货号：PE403

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	10 次(PE403-01)
RNaseA(10mg/mL)	4°C	750μL
溶液 P1	4°C	77mL
溶液 P2	室温	77mL
溶液 N3	室温	77mL
内毒素清除剂	-20°C	25mL
去蛋白液 PE	室温	63mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 WB	室温	25mL*2 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	20mL
吸附柱 DC 和收集管(50mL)	室温	10 套

◆**产品储存：** 本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。内毒素清除剂常温运输，4 度可以保存一个月，-20°C 长期保存。

◆**储存事项：**

- 第一次使用时，将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后(终浓度 100ug/mL)置于 4°C 保存。如果溶液 P1 中 RNase A 失活，提取的质粒可能会混杂有微量 RNA 残留，在溶液 P1 中补加 RNase A 即可。
- 环境温度低时溶液 P2 中 SDS 可能会析出出现浑浊或者沉淀，可在 37°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清，不要剧烈摇晃，以免形成过量的泡沫。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

◆**产品介绍：**

本试剂盒采用改进 SDS-碱裂解法裂解细胞，粗提物通过爱普科学独特的内毒素清除剂选择性结合离心除去内毒素，然后离心吸附柱内的硅基质膜在高盐、低 pH 值状态下选择性地结合溶液中的质粒 DNA，再通过漂洗液将杂质和其它细菌成分去

除，最后低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅基质膜上洗脱。

本试剂盒配备了爱普科学独特的专用内毒素清除剂，提取的质粒纯度非常高，提取的质粒内毒素含量极低( $<0.1$  EU/ $\mu$ g DNA)，提取的质粒除用于常规的 PCR、酶切、转化等实验外，还非常适合用于原生质体转染实验。

#### ◆产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好，克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 不需要使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。
3. 快速方便，从 150-300mL 大肠杆菌 LB((Luria-Bertani)培养液中，可快速提取 0.5-2mg 纯净的高拷贝质粒 DNA，提取率达 80-90%。
4. 独特工艺配方清除内毒素，内毒素含量极低( $<0.1$  EU/ $\mu$ g DNA)，细胞转染效果极佳，也可直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、等各种分子生物学实验。

#### ◆注意事项：

1. 所有的离心步骤如未加另外说明均在室温完成，使用转速可以达到 12,000xg，带 50mL 转头的台式离心机。
2. 提取的质粒质量与细菌培养浓度、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 10kb 的大质粒，应加大菌体使用量，同时按比例增加 P1、P2、N3 的用量，洗脱缓冲液应在 70°C 预热。可以适当的延长吸附和洗脱的时间，以增加提取效率。
3. 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 $\mu$ g/mL DNA。电泳可能为单一条带，也可能为 2 条或者多条 DNA 条带，这主要是不同程度的超螺旋构象质粒泳动位置不一造成，与提取物培养时间长短、提取时操作剧烈程度等有关。本公司产品正常操作情况下基本超螺旋可以超过 90%。
4. 质粒 DNA 确切分子大小，必须酶切线性化后，对比 DNA 分子量 Marker 才可以知道。处于环状或者超螺旋状态的质粒，泳动位置不确定，无法通过电泳知道其确切大小。
5. 洗脱液 EB 不含有螯合剂 EDTA，不影响下游酶切、连接等反应。也可以使用水洗脱，但应该确保 pH 大于 7.5，pH 过低影响洗脱效率。用水洗脱，质粒应该保存在 -20°C。质粒 DNA 如果需要长期保存，可以用 TE 缓冲液洗脱(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)，但是 EDTA 可能影响下游酶切反应，使用时可以适当稀释。

#### ◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项)：

**提示** 首次使用前请先在漂洗液 WB 和去蛋白液 PE 瓶中按照该组分标签上的指示，加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！将 RNase A 全部加入溶液 P1 中，混匀，每次使用后置于 2-8°C 保存。

1. 取 150-200mL(最多不超过 300mL)过夜培养的菌液，12,000xg(约 10,000rpm)，离心 1 分钟，尽可能的倒干上清，收集菌体。  
**注：**收集超过 50 毫升菌液，可以离心弃上清后，在同一个 50mL 管内加入更多的菌液，重复步骤 1，直到收集到足够的菌体。
2. 用 7.5mL 溶液 P1 重悬菌体沉淀，移液器吹打或者涡旋振荡至彻底悬浮。  
**注：**如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。
3. 加 7.5mL 的溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置 4-5 分钟。  
**注：**温和地混合，不要剧烈震荡，以免基因组 DNA 剪切断裂！所用时不应超过 5 分钟！以免质粒受到破坏。此时菌液应变得清亮粘稠。如果很浑浊，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。
4. 加 7.5mL 溶液 N3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀此时会出现白色絮状沉淀。12,000xg 离心 10-15 分钟，小心取上清至新管，避免吸取到漂浮白色沉淀。  
**注：**加入溶液 N3 后应该立即混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀。
5. 加入 0.1 体积(上清的体积的 10%，约 2.4mL)的内毒素清除剂到上一步所得上清，颠倒旋转混匀，冰浴或者插入碎冰中(或冰箱冷冻室)放置 5 分钟直到浑浊变清亮透明(或仍旧稍有浑浊)，中间偶尔混匀几次。  
**注：**内毒素清除剂加入上清后，上清会变得浑浊，但是冰浴后应恢复清亮(或稍浑浊)。
6. 常温放置 3-5 分钟，温度恢复室温溶液很快变为浑浊，颠倒混匀。  
**注：**如室内温度较低或者想加快速度可以在 37-42°C 水浴，将很快变浑浊，颠倒混匀。
7. 室温 12,000xg 离心 10 分钟分相。上层水相含 DNA，下层蓝色油状相含内毒素和其它杂质。将含 DNA 的上层水相转移到新管(注意不要吸到蓝色油状层，里面含内毒素等杂质)，弃油状层。
8. 向上层水相中加入 0.5 体积异丙醇(约 11mL)后充分颠倒混匀后分多次(每次不超过 10mL，因个别情况下离心机转子倾角较大，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10mL，以防产生漏液现象)转入吸附柱 DC 中(吸附柱放入收集管中)，12,000xg 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。直到所有混合溶液通过此吸附柱。
9. 加入 10mL 去蛋白液 PE(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000xg 离心 1 分钟，弃掉废液。

**注：**此步骤为了去除痕量核酸酶等杂质，如所用菌株为 JM 系列、HB101 等 endA 菌株或野生型菌株，核酸酶含量丰富，应加此步骤，如所用菌株为 XL-1 Blue、Top10 和 DH5 $\alpha$  等缺陷型菌株，核酸酶含量低，则可略过此步骤。

- 加入 10mL 漂洗液 WB(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000xg 离心 1 分钟，弃掉废液。再加入 10mL 漂洗液 WB，重复漂洗一次。
- 将吸附柱 DC 放回空收集管中，最高速(最好大于 12,000xg)离心 3 分钟以干燥基质膜上残留乙醇。打开盖子室温晾干 2-3 分钟。

**注：**该步骤为彻底去除吸附柱中残留乙醇，残留乙醇抑制下游反应并且严重降低洗脱效率，降低质粒产量。

- 取出吸附柱 DC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 1-2mL 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70°C 水浴中预热可提高产量)，室温放置 2 分钟，12,000xg 离心 1-2 分钟。

**推荐：**为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 1 分钟，12,000xg 离心 1-2 分钟。洗脱两遍可提高浓度约 10%。

**注：**洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要质粒浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是需注意体积过小降低质粒洗脱效率，减少质粒产量(最小不应少于 1mL)。

=====



扫码关注我们