GNM 无内毒素质粒大提试剂盒(10T)说明书

【产品名称】GNM 无内毒素质粒大提试剂盒(10T)

【产品货号及规格】

货号	规格
TQ-J012-10	10T

【产品介绍】

内毒素是质粒提取中常见的污染物。由于真核细胞对内毒素非常敏感，若质粒中含有内毒素，会显著降低真核细胞转染效率。本试剂盒基于碱裂解法裂解细胞，采用独特的硅基质膜吸附技术，高效专一地结合质粒 DNA；同时利用特殊的去内毒素 Buffer ER 和 Endo Remover FQ，有效去除内毒素、蛋白质等杂质。试剂盒配备特殊指示剂 GNMBlue，确保质粒提取高效完成。

每次可处理 100-300 mL 菌液，所得质粒纯度高、提取量大，可获得多达 2 mg 转染级质粒 DNA，适用于 DNA 测序、PCR、体外转录、内切酶消化等实验。

【产品组成】

组分	装量（10T）
Buffer P1	125mL
Buffer P2	125mL
Buffer E3	125mL
Buffer PS	30mL
Buffer PW(浓缩)	50mL
Endo-Free Buffer EB	30mL
RNaseA (10mg/mL)	2mL
Buffer ER	50mL
Buffer PB	100mL
GNMBlue	3mL
Spin Columns DZ with Collection Tubes	2x5 sets
Endo-Remover FQ	2x5 sets
Centrifuge Tubes (50mL)	2x5 sets

自备试剂：无水乙醇、异丙醇。

【使用说明】

操作流程一（快速版）

1. 取 150mL 过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，12,000×g 离心 2~3 分钟收集细菌，尽量吸弃全部上清。

注意：提取菌液量可参考附件。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 12mL Buffer P1（请先检查是否已加入 RNase A）以及 120μL GNMBlue，使用移液器或涡旋振荡器充分混匀，悬浮细菌沉淀。

注意：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，使提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入 12mL Buffer P2，温和地上下颠倒混匀 8~10 次，使菌体充分裂解，室温放 置 5 分钟。此时溶液应变得清亮粘稠。

注意：

1）温和混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。

2）如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量。

3）加入溶液 P2 至充分混匀后，溶液呈现均一蓝色，无明显白色絮状物，则表明菌体细胞裂解充分。

4. 向离心管中加入 12mL Buffer E3，立即上下颠倒混匀 8~10 次，至出现白色沉淀，室温放置 5 分钟。

注意：Buffer E3 加入后应立即颠倒混匀，避免产生局部沉淀，溶液呈现无色透明，并漂浮有松散的豆花状白色沉淀物，则说明中和充分。

5. 柱平衡：向已装入收集管中的吸附柱（Spin Columns DZ）中加入 2mL Buffer PS，12,000×g 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中，待第 8 步备用。

注意：柱平衡后建议静置 15~30 分钟待第 8 步使用（建议不超过 30 分钟），可提升吸附柱性能，提高提取得率。

6. 第 4 步完成后，12,000×g 离心 10 分钟，将上清全部倒入除内毒素过滤器（Endo-Remover FQ）中，尽量不要倒入大块沉淀，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的 50mL 离心管（自备）中。

7. 加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

8. 将上清与异丙醇的混合溶液转移到步骤 5 已平衡好的吸附柱 DZ（已装入收集管）中。12,000×g 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：吸附柱的最大容积为 15mL，可分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10mL，以防发生漏液现象。

9. 向吸附柱中加入 10mL Buffer PW（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000×g 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

10. 重复步骤 9。

11. 将吸附柱重新放回收集管中，12,000×g 离心 5 分钟，倒掉废液，将吸附柱置于室温 5 分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

12. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位加入 1~3mL Endo-Free Buffer EB，室温放置 2~5 分钟，12,000×g 离心 5 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20℃保存质粒。

注意：

1）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，室温放置 2~5 分钟，12,000×g 离心 5 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2）质粒拷贝数较低或>10kb 时，Endo-Free Buffer EB 在 65~70℃水浴预热，可以增加提取效率。

操作流程二（内毒素去除加强版）

1. 取 150mL 过夜培养的菌液，加入离心管（自备）中，12,000×g 离心 2-3 分钟收集细菌，尽量吸弃全部上清。

注意：提取菌液量可参考附件。

2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 12mL Buffer P1（请先检查是否已加入 RNase A）以及 120μL GNMBlue，使用移液器或涡旋振荡器充分混匀，悬浮细菌沉淀。

注意：如果菌块未彻底混匀，将会影响裂解效果，使提取量和纯度偏低。

3. 向离心管中加入 12mL Buffer P2，温和地上下颠倒混匀 8-10 次，使菌体充分裂解，室温放置 5 分钟。此时溶液应变得清亮粘稠。

注意：

1）温和混匀，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片段。

2）如果溶液未变得清亮，提示可能菌量过大，裂解不彻底，应减少菌体量。

3）加入溶液 P2 至充分混匀后，溶液呈现均一蓝色，无明显白色絮状物，则表明菌体细胞裂解充分。

4. 向离心管中加入 12mL Buffer E3，立即上下颠倒混匀 8-10 次，至出现白色沉淀，室温放置 5 分钟。

5. 柱平衡：向已装入收集管中的吸附柱（Spin Columns DZ）中加入 2 mL Buffer PS，12,000×g 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中,待第 9 步备用。

注意：柱平衡后建议静置 15-30 分钟待第 9 步使用（建议不超过 30 分钟），可提升吸附柱性能，提高提取得率。

6. 完成第 4 步后，12,000×g 离心 10 分钟，将上清全部倒入除内毒素过滤器（Endo-Remover FQ）中，尽量不要倒入大块沉淀，慢慢推动推柄过滤，滤液收集在干净的 50mL 离心管（自备）中。

注意：Buffer E3 加入后应立即颠倒混匀，避免产生局部沉淀，溶液呈现无色透明，并漂浮有松散的豆花状白色沉淀物，则说明中和充分。

7. 加入 0.1 倍滤液体积的 Buffer ER，上下颠倒混匀。

8. 加入 0.3 倍上清体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

9. 将步骤 8 的混合溶液转移到步骤 5 已平衡好的吸附柱 DZ（已装入收集管）中。12000×g 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注：吸附柱的最大容积为 15 mL，可分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 mL，以防发生漏液现象。

10. 可选步骤：向吸附柱中加入 10 mL Buffer PB，12,000×g 离心 2 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注：当 ODV 大于 400 时建议使用 Buffer PB，避免出现纯度降低情况。

11. 向吸附柱中加入 10mL Buffer PW（请先确认是否已加入无水乙醇），12000×g 离心 2 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管中。

12. 重复步骤 11。

13. 将吸附柱重新放回收集管中，12000×g 离心 5 分钟，倒掉废液，将吸附柱至于室温 5 分钟，已彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。

注：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

14. 将吸附柱置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位加入 1-3mL Endo-Free Buffer EB，室温放置 2-5 分钟，12000×g 离心 5 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20℃保存质粒。

注意：

1）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，室温放置 2-5 分钟，12,000×g 离心 5 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

2）质粒拷贝数较低或>10kb 时，Endo-Free Buffer EB 在 65~70℃水浴预热，可以增加提取效率。

【注意事项】

1. 加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8℃可稳定保存 6 个月。

2. 第一次使用前，按照试剂瓶标签的说明在 Buffer PW 中加入无水乙醇；第一次使用前，将 RNase A 溶液全部加到 Buffer P1 中混匀，于 2~8℃保存，使用前需在室温中放置一段时间，恢复至室温后使用。

3. 使用前请先检查 Buffer P2、Buffer E3、Buffer ER 是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀现象，可在 37℃水浴几分钟，即可恢复澄清。

4. 注意 Buffer P2 和 Buffer E3 含有刺激性物质，请戴手套操作，使用后应立即盖紧盖子。

5. 使用 Buffer PS 处理过的吸附柱放置 15~30min 后再进行混合液过柱，效果较好，不建议放置超过 30min 使用。

6. GNMBlue 的使用方法：GNMBlue 是一种指示剂。请按照 GNMBlue：溶液 P1=1:100 进行混合，充分混匀。加入溶液 P2 至充分混匀后，溶液呈现均一澄清的蓝色，则表明菌体细胞裂解充分；再加入溶液 E3 至充分混匀后，溶液呈现无色透明，且漂浮有白色絮状沉淀物，表明中和复性反应已充分。

【保存条件及有效期】 15~30℃保存 2 年。

【运输条件】 室温运输。

【附件】

推荐提取菌液量

提取质粒的量和纯度与细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素有关。

1. 高拷贝质粒：表 1 中 ODV=OD_{600}×V，V 为菌液量（mL），即单次处理量应不超过表 1 中推荐的 ODV=800，对应菌体沉淀湿重约为 1.4g，亦可作为参考。表 1 列出了各菌液 OD_{600} 所对应的单次最大使用菌液量 V（mL），P1、P2 和 E3 溶液的用量均为 12mL 时，单次使用菌液量应不超过表 1 中推荐的体积。

表 1. 高拷贝质粒单次最大使用菌液量，V (ml)

湿重	ODV	OD_{600}=2	OD_{600}=4	OD_{600}=6	OD_{600}=8	OD_{600}=10
1.4g	800	400mL	200mL	133mL	100mL	80mL

2. 低拷贝质粒：表 2 中 ODV=OD_{600}×V，V 为菌液量（mL），即单次处理量应不超过表 2 中推荐的 ODV=600，对应菌体沉淀湿重约为 1.0g，亦可作为参考（如需增加菌液量或提高得率则需按表 4 增加溶液用量）。表 2 列出了各菌液 OD_{600} 所对应的单次最大使用菌液量 V（mL），P1、P2 和 E3 溶液的用量均为 12mL 时，单次使用菌液量应不超过表 2 中推荐的体积。

表 2. 低拷贝质粒单次最大使用菌液量，V (ml)

湿重	ODV	OD_{600}=2	OD_{600}=4	OD_{600}=6	OD_{600}=8	OD_{600}=10
1.0g	600	300mL	150mL	100mL	75mL	60mL

3. 如需提高质粒得率，可以适当增加菌液量（菌液量超过上述表 1、表 2 中推荐使用量时），同时溶液 P1、P2 和 E3 的用量相应进行调整，高拷贝质粒可参考表 3，低拷贝质粒可参考表 4：

表 3.				
ODV	1140	1030	915	800
湿重	2.0g	1.8g	1.6g	1.4g
P1、P2、E3 使用量	18mL	16mL	14mL	12mL

表 4.				
ODV	1200	960	780	600
湿重	2.0g	1.6g	1.3g	1.0g
P1、P2、E3 使用量	24mL	20mL	16mL	12mL

【基本信息】

生产企业名称/售后服务单位：北京金诺美科技股份有限公司

住所：北京市大兴区永旺西路 26 号院中关村医疗器械园 10 号楼

联系方式：010-67880228

【说明书版本及修改日期】本说明书已正式发布，版本为 V1.1，本次修订日期为 2026 年 01 月 28 日。

【免责声明】本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途。