

无内毒素质粒快速大提试剂盒 (PLUS)

(使用说明书Ver.1.2.0)

产品说明

- ✧ 独有的显色反应可以直接观察到细胞混悬、裂解或反应液中中和的程度，极大地方便操作者判断实验状态。
- ✧ 快速、方便，不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀。获得的质粒产量高、纯度好。
- ✧ 独有的内毒素去除方案，超滤内毒素吸附柱，搭配专业的内毒素去除液，内毒素充分溶解，内毒素含量可低至 $\leq 0.05\text{EU}/\mu\text{g}$ ，且质粒纯度优异，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染等各种敏感分子生物学实验。
- ✧ 此产品仅供科研使用。

产品货号：

TD421-PLUS (2次反应) TD421-PLUS (10次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

目录Contents

产品组份	1
注意事项	1
产品特性	2
溶液制备	2
操作步骤	3
第一部分 质粒DNA提取	3
◇ 负压操作步骤	3
◇ 离心操作步骤	4
第二部分 内毒素去除操作	4
FAQ常见问题及解决方法	6
产品推荐	9
组件查询	10

产品组份

试剂盒组成	2次	10次	保存
RNaseA溶液	300 μ l	1ml+600 μ l	4°C
P1 (红色)	30ml	150ml	4°C
P2	30ml	150ml	室温
P3	30ml	150ml	室温
内毒素去除液	80ml	2*200ml	4°C
Endo-free质粒DNA洗涤液	20ml	5*20ml	室温
	第一次使用前按说明加指定量乙醇		
无DNase / RNase 水	5ml	20ml	室温
5号PX纯化柱+15ml漏斗X	2个	2*5个	室温
6号 内毒素去除柱+50ml漏斗	2个	10个	室温
50ml 螺旋盖尖底离心管	4个	20个	室温
注射器内芯	2个	10个	室温
注射器外套 (含滤网)	2个	10个	室温

注意事项

- ✧ 全程操作应尽量在超净台中进行。所用耗材或移液器，应定期采用高温高压灭菌、紫外消毒或次氯酸擦拭等方式处理，确保内毒素处理环境符合标准。
- ✧ 无DNase / RNase 水、双蒸水及鲎试剂检测专用水均应避免敞口放置。在操作过程中，需及时更换移液器吸头，防止引入外源性内毒素，影响最终实验结果准确性。
- ✧ 环境温度较低时，溶液P2中SDS可能会析出沉淀，可在37°C水浴加热几分钟使其恢复澄清，避免剧烈摇晃，以防产生过量泡沫。
- ✧ 内毒素去除液需在4°C保存。低温条件下，内毒素去除液可能出现浑浊现象，但不影响使用，使用前摇匀后用移液器吸取即可。

- ✧ 提取质粒的产量与细菌培养的 OD值、拷贝数等因素相关。过多的菌液不仅无法提高产量，还会削弱裂解效果，降低质粒浓度和纯度。此外，过多菌量还可能导致RNA污染，使细菌内毒素超标。菌液细胞数量应严格按照OD值标准操作，并符合下述操作步骤中标注的菌液上样量（一般情况为：例如OD值=3时，菌液用量不超过 300ml，准确的比例用量请参照文章末尾的附图）。
- ✧ 本产品自售出之日起提供一年质量保证。所有试剂均通过严格质量检测，确保性能稳定可靠。
- ✧ 本产品仅供专业研究人员在受控环境下使用。操作人员须佩戴防护手套及护目装置等个人防护装备，并严格遵守所在机构的安全操作规程。请注意，部分试剂可能具有刺激性，使用时需特别谨慎。
- ✧ 避免试剂长时间暴露于空气中，以防挥发、氧化或pH值变化，使用后请立即盖紧瓶盖，并按照说明书要求妥善储存。

产品特性

- ✧ DNA纯度：获得的质粒产量高、纯度高，可以直接用于酶切、转化、PCR、体外转录、测序、转染等各种分子生物学实验。一般情况Abs260/280 \geq 1.8，Abs260/230 \geq 2.0。
- ✧ 内毒素含量范围：0.05EU/ μ g~1EU/ μ g，内毒素去除后，高纯度质粒DNA的回收率可达60%~80%（过多的菌液投入量会导致内毒素基础含量升高，可能使处理后的内毒素含量无法达到标识级别，请严格按照下述步骤中标示的菌液上样量操作）。
- ✧ 质粒DNA产量：约 \geq 1mg。
- ✧ 质粒DNA大小：可达80 kb。（片段长度因菌种不同而有所差异）。
- ✧ 洗脱体积：800 μ l~1ml。
- ✧ 操作温度：室温（ \leq 25°C），过高的实验温度或者操作环境，易导致试剂化学性质发生变化。
- ✧ 操作时间：质粒粗提时，负压法 \leq 20min，离心法 \leq 30min；内毒素去除 \leq 45min。

溶液制备（使用之前需要配制）

- ✧ 第一次使用时，将试剂盒所带的全部RNaseA加入溶液P1，使其终浓度达到~100 μ g/ml，随后将溶液置于2-8°C保存。如果溶液P1中RNaseA失活，提取的质粒可能会有微量RNA残留，此时在溶液P1中补加RNaseA即可。
- ✧ 添加 80ml 无水乙醇到 20ml 的Endo-free质粒DNA洗涤液中（现用现加，勿提前加乙醇到各洗涤液瓶中）并充分混匀。
- ✧ 需自备经高温高压灭菌过的反应容器，如50ml离心管， \geq 75ml 或更大的反应瓶（P3中和后的干净上清与内毒素去除液反应使用）。

操作步骤（分为两部分）

第一部分：质粒DNA提取

1. 准备150ml~300ml 过夜培养的菌液，离心收集菌体（尽量使用50ml干净的无酶管，**避免外源性内毒素的带入**）
2. 用15ml P1（红色）重悬菌体，用移液器吸头反复吹打至菌体完全悬浮，或涡旋振荡数次，**此时混悬的菌液为质地均匀的玫红色**。（如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15ml P2，温和地上下翻转数次，裂解菌液细胞，室温放置 $\leq 5\text{min}$ ，使其进一步裂解。**此时，溶液应呈澄清透亮的淡粉色**。
(操作时需温和和混匀，避免剧烈振荡以防破坏质粒DNA，且时间不应超过5分钟。若菌液很快变得清亮粘稠，说明菌体较少，应尽快进行下一步操作。若菌体过多，菌液呈不明显透亮的淡粉色，5分钟后也需继续下一步操作。)
4. 加15ml 溶液P3，温和地上下翻转数次，**直至红色液相完全消失，转为黄色液相**，并伴随大量白色絮状物出现，在 $\geq 3500\text{g}$ 离心力下离心10分钟，使得絮状物尽量凝聚至容器底部。
5. 准备 $\geq 75\text{ml}$ 干净的容器，收集过滤液（灭菌处理过的容器自备），拧开试剂盒中注射器下端接头，将上一步离心好的混合液慢慢倒入注射器内，注射器对准干净的容器，缓慢推动注射器收集上清（大约会收集到40ml左右的过滤液）。
6. 上述过滤液中加入30ml 内毒素去除液，剧烈振荡10次左右，随后手动或涡旋振荡混匀15分钟。若使用台式混样器 360° 翻转混匀15分钟，效果更佳。混匀后，将混合液静置备用。

以下步骤可以通过真空负压的方式，也可以通过离心的方式进行操作（负压设备，所用真空泵，及真空多联器推荐使用简石生物™的产品。）

✧ 负压操作步骤：

1. 准备5号PX 纯化柱并拧下**15ml漏斗**，**备用勿扔**，然后将5号PX纯化柱螺旋口处连接**6号内毒素去除柱**及**50ml漏斗**，并连接在真空多联器上，倒入上述第6步备用的混合液，打开真空开关使液体完全通过**内毒素去除柱和纯化柱**。
2. **拧下6号内毒素去除柱扔掉，并重新连接上述15ml漏斗**。
3. 向15ml漏斗中，加入10ml Endo-free质粒DNA洗涤液（请先检查是否已加入无水乙醇！），打开真空开关，让液体完全通过5号PX纯化柱。
4. 重复第2步，然后去掉漏斗，将5号PX纯化柱套在一个1.5ml \ 2ml EP收集管上， $\geq 16000\text{g}$ ，离心1min，去除残留乙醇。
5. 将5号PX柱套在**另一个干净的2ml EP 管**上，添加 800 μl 的无DNase / RNase 水到纯化柱上。缓慢添加，充分浸润纯化柱基质，无DNase / RNase 水 事先在55~65 $^\circ\text{C}$ 水浴中预热，洗脱效

果更好，室温孵育放置5分钟， $\geq 16000g$ ，离心1min 洗脱质粒DNA。（请自行选择合适的，确认灭菌或无酶化处理过的容器，避免外源性内毒素的带入）

NOTE:所有经过消毒或无酶化处理的耗材和容器均须规范使用，以避免外源性内毒素污染，这有助于下游转染实验。

✧ 离心操作步骤：

1. 准备5号PX纯化柱并拧下**15ml漏斗**，**备用勿扔**，然后将5号PX纯化柱螺旋口处连接**6号内毒素去除柱**（去掉50ml漏斗，离心操作法不需要它）放置在50ml干净的螺旋盖尖底离心管中，倒入上述第6步备用的混合液，离心力 $\leq 1000xg$ ，离心1min，倒掉离心管中的废液。**重复此步骤，直到混合液全部通过6号内毒素去除柱和5号PX纯化柱。**

NOTE:请注意6号内毒素去除柱的液体承载体积， $\leq 15ml$ 。

2. 拧下**6号内毒素去除柱**扔掉，并重新连接上述**15ml漏斗**。
3. 向15ml漏斗中，加入10ml Endo-free质粒DNA洗涤液（请先检查是否已加入无水乙醇！），离心力 $\leq 1000xg$ ，离心1min，弃废液。
4. 重复第2步，然后去掉漏斗，将5号PX纯化柱套在一个1.5ml \ 2ml EP收集管上， $\geq 16000g$ ，离心1min，去除残留乙醇。
5. 将5号PX柱套在另一个干净的2ml EP管上，添加800 μ l的无DNase / RNase水到纯化柱上。缓慢添加，充分浸润纯化柱基质，无DNase / RNase水事先在55~65°C水浴中预热，洗脱效果更好，室温孵育放置5分钟， $\geq 16000g$ ，离心1min 洗脱质粒DNA。（请自行选择合适的，确认灭菌或无酶化处理过的容器，避免外源性内毒素的带入）

NOTE:任何形式的经过消杀，无酶化处理的反应耗材或容器，应得到操作者的关注，避免外源性内毒素的带入，请尽量使用，有助于下游转染实验。

第二部分：可选步骤，如需更低的内毒素含量，执行下列内毒素去除操作（质粒DNA进一步纯化，内毒素残留或RNA残留有效去除）

1. 上述第一部分质粒提取，洗脱得到的质粒DNA，缓慢、均匀地转移至干净的15ml离心管内，加入200 μ l P1，充分混匀5min。
2. 15ml离心管内加入5倍体积的内毒素去除液（例如：质粒1ml加入内毒素去除液5ml），充分混匀 $\geq 30min$ 。可间断手动摇匀或涡旋混匀，使用台式混样器360°翻转混匀更佳。此时，会有大量不溶核酸结晶出现。

NOTE:时间要求对内毒素的溶解及结晶凝结至关重要，请严格按照时间要求，反应时间不低于30min，此时核酸结晶现象明显。若凝结现象不出现，补加内毒素去除液1~2ml即可。

3. 上述反应体系混匀操作完成后，高速离心，离心力 $\geq 12000g$ ，离心时间 $\geq 10min$ ，收集白

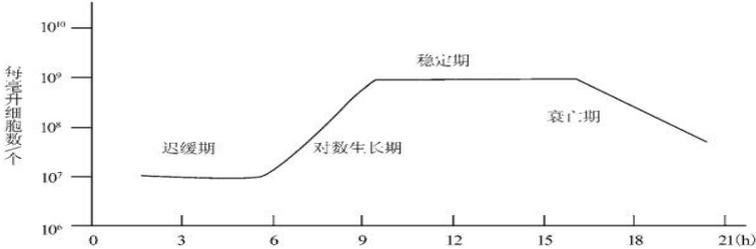
色结晶（如果离心机达不到上述离心力，可采用 $\geq 4000g$ 的离心力，离心 30min）。小心地使用移液器吸弃上清，不要碰到固定于反应管底部的白色结晶，以免发生损耗。

4. 加入 10 ml Endo-free 质粒 DNA 洗涤液，剧烈振荡几次，尽量打散冲洗管底部结晶，也可涡旋，然后离心力 $\geq 12000\times g$ ，时间 ≥ 10 min，收集白色结晶（如果离心机达不到上述离心力，请以 $\geq 4000g$ ，离心 30min）。小心地使用移液器吸弃上清，不要碰到底部的结晶。
5. 重复上一步骤一次，如反应管中有上清废液微量残留，使用小量程移液器小心吸弃即可，不要碰到底部结晶；将反应管底部的结晶晾干，时间 ≤ 5 min，以促使醇类残留挥发，避免过度晾干，导致洗脱复溶困难。
6. 无 DNase/RNase 水 1~2ml，涡旋振荡，充分溶解上一步室温晾干的底部结晶。（建议 $55^{\circ}\sim 65^{\circ}$ 加热无酶水进行洗脱，增加洗脱效率。）

Note 1: 可选步骤，上述第二部分步骤 1~6 内毒素去除和纯化脱盐操作后，质粒 DNA 已达到转染级别，内毒素级别低至 $0.05 \sim 1$ EU/ μg （根据不同的菌液上样量而定，更多的菌液量意味着更高的内毒素含量）。依托全文操作，科研人员可摸索内毒素去除及转染的条件。

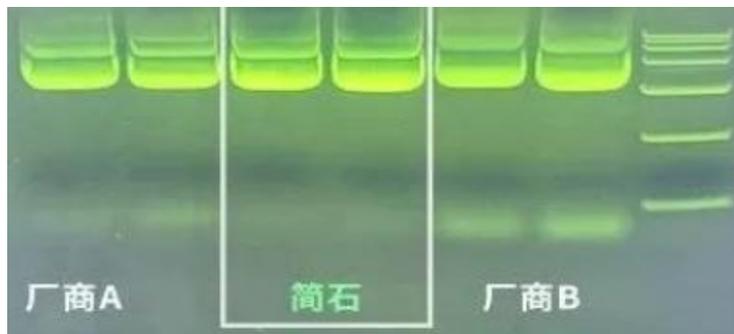
Note 2: 内毒素有效去除的过程，伴随质粒 DNA 浓度下降属于正常情况（浓度下降幅度一般在 10%~30%）。刚开始使用 Nanodorp 分光光度计检测质粒浓度时，所得结果可能因存在 RNA 残留或有机物残留而出现偏差，如虚高的情况。而利用本试剂盒进行纯化及内毒素去除后，高达 98% 以上为单纯的质粒 DNA 分子。

FAQ常见问题及解决方法

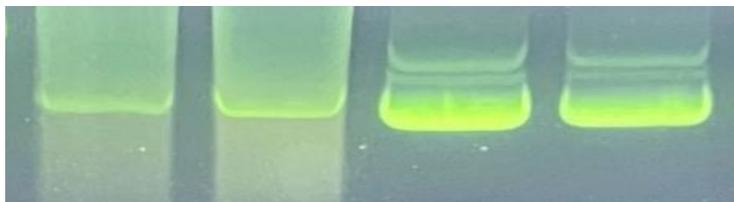
Q: 问题	A: 可能的原因和推荐的解决方案
<p>如何进行标准的菌液培养以避免杂菌污染</p>	<p>a) 需在无菌操作环境下进行，达到二级生物安全防护标准，并对设备常规消杀（如 2mg/ml 次氯酸或者 75%乙醇，V/V），使用的相关耗材，采用正确的灭菌方式，如下：</p> <ul style="list-style-type: none"> ✧ 普通型下排气式压力蒸气灭菌器，压力升至 103.4kPa (1.05kg/cm²) 温度达 121.3°C，维持 15~30 分钟，可达到灭菌目的。 ✧ 严谨型脉冲真空压力蒸气灭菌器，蒸气压力 205.8kPa (2.1kg/cm²)，温度达 132°C 以上并维持 20 分钟，可彻底杀灭包括芽孢和孢子在内的所有微生物。 <p>b) 挑取单菌落小量培养后转大体积培养，注意溶氧量的问题，培养总体积不要过大，一般为培养瓶的 20% 体积，使用透气性好的封瓶膜，转数 200rpm~250rpm。</p> <p>c) 注意观察菌落形态，确保无杂菌污染，正确选择抗生素至关重要，培养基的 pH=7.2，培养时间 8~16H 温控在 37°C。</p> 
<p>质粒得率低或没有</p>	<p>a) 部分质粒本身不稳定，频繁转接可能造成质粒丢失，每次接种应接种单菌落，并确认选用的抗生素浓度是否正确。</p> <p>b) 质粒抽提试剂使用不当：P2 在温度较低的情况下会出现浑浊，降低对细胞膜的裂解效率，使得质粒产量低，立即将试剂置于 37°C 左右的水浴中复溶后使用，正确的细胞数量裂解后应呈现粘稠透亮的液相。若仍出现部分浑浊现象，说明有少量大肠杆菌细胞未能裂解。</p> <p>c) OD 值对质粒提取至关重要，最佳性能提取时的最佳吸光值对应的细胞数量应保持 OD 值=5，可选择自然过夜培养的菌液，稀释约十倍，或自行稀释最佳性能的 OD 值。（OD 值是细胞数量，与说明书当中的标注上样量两者皆满足条件，才能得到最好的实验结果）</p> <p>d) P3 中和过程的重要性：中和状态应该是呈现稀松状，有质地较轻的物质漂浮到液面顶端，大肠杆菌中的蛋白质、破裂的细胞膜和变性的染色体会相互缠绕成大型复合物，在离子交换过程中，复合物会从溶液中有效地沉淀下来，有效去除基因组 DNA 并提高得率，离心除去沉淀后，就可以从上清中回收复性的质粒 DNA。过多菌量并不一定能带来更多的质粒 DNA，反而造成提取过程当中不必要的麻烦，如堵柱子，导致得率较低。</p>

RNA 残留多，内毒素超标。

- a) 过多的细胞数量会导致 RNA 残留过多，导致 RNaseA 活性饱和，不能消化掉更多的 RNA。RNA 残留过多影响核酸浓度值，使浓度纯度数据不准确。解决办法为降低菌液量，严格按照标注的 OD 值进行操作，或调高 RNaseA 的浓度（若杂菌过多，会导致 RNA 含量升高）。
- b) 不同菌种的 RNA 和内毒素基础含量存在差异，因此需尝试不同条件提取质粒。例如：可调高 RNaseA 的浓度（出厂默认浓度为 100 μ g/ml）；若内毒素含量过高，可重复使用内毒素去除柱。（注意：RNA 残留过多会导致质粒总浓度虚高，而通过有效去除 RNA 或多次使用内毒素去除柱后，质粒总浓度会降低，此属正常现象）
- c) 质粒 DNA 质量标准
- ✧ 电泳点样孔出现异常亮带：质粒中污染细菌基因组 DNA，多是由于 P2 加入后振荡过于剧烈，导致基因组 DNA 剪切，或放置时间过长。
 - ✧ 质粒 DNA 条带下方 500bp 左右有条带或者荧光团的存在，说明存在 RNA 残留，需调整参与提取的菌液用量，或者调整 RNaseA 的浓度；



- ✧ 电泳条带不完整，呈现弥散状。



从电泳结果来看，前两孔的样品存在杂菌DNA污染，裂解不充分以及洗涤液性能衰退等问题。后两孔的样品为正常质粒提取的结果，其浓度及纯度达到性能标准，条带完整，无基因组DNA和RNA污染，无降解现象。

内毒素级别在各领域的要求标准	质粒级别	内毒素标准范围	主要应用场景	附加说明	
	测序级	>50 EU/μg	常规测序、克隆等基础实验	不适用于细胞相关实验	
	转染级	<0.50EU/μg	普通细胞转染	需结合质粒纯度优化转染效率	
	超低残留级	<0.05 EU/μg	实验室级别 AAV 生产、CAR-T 研究	需特殊纯化工艺支持	
	无内毒素级	≤0.025 EU/μg	基因治疗、临床前研究、高敏感细胞转染	符合科研级质粒的高标准要求	
	治疗级 (推测标准)	≤0.01 EU/μg	基因药物生产、人体应用	需符合 GMP 规范及药典热原控制标准	
菌液细胞数量与正确上样量标准	以下标示数值均为性能上限值。				
	提取规格	小量纯化菌液量	中量纯化菌液量	大量纯化菌液量	备注
	菌块湿重	100mg	750mg	2.5g	体积及质量均为上限
	OD₆₀₀=2	35ml	125ml	375ml	
	OD₆₀₀=4	17.5ml	60ml	185ml	
	OD₆₀₀=6	12.5ml	40ml	125ml	
	OD₆₀₀=8	9.5ml	30ml	95ml	
OD₆₀₀=10	7.5ml	25ml	75ml		

产品推荐

质粒试剂盒分类	小量提取	小提中量		中量提取		大量提取		质粒提取小范围客户定制需求	
货号	TD427	TD435	TD436	TD418	TD419	TD421	TD423	TD419-VS	TD421-VS
产品名	质粒超快速小量提取	质粒超快速小提中量	质粒小提中量	质粒超快速中量提取	质粒快速中量提取	质粒快速大量提取	质粒超快速中量提取	质粒快速中量提取	质粒快速大量提取
产品特点(方法)	速度快,无需其它有机试剂辅助,例如:柱平衡液、质粒结合液、氯仿、异戊醇、异丙醇等。	速度快,无需其它有机试剂辅助,描述同上。	质粒结合液法	速度快,无需其它有机试剂辅助,描述同上。	异丙醇法	异丙醇法	速度快,无需其它有机试剂辅助,描述同上。	异丙醇法小范围定制: ①TD419-VS部分客户需求次数达到50次与价格与竞品品牌有优势。 ②TD421-VS部分客户需求菌液使用量能达到300ml。	
菌液用量(ml)	1~5ml	5~20ml		50ml		100~150ml		50ml	300ml
OD值细胞数量	OD=3~5								
质粒结合柱分类	2PX-CN	3PN	3PN	5PS-N	5PS	5PX	6P-N	5PS	5PX
提取时间(负压)	≤6min	≤10min	≤15min	≤10min	≤15min	≤20min	≤15min	≤10min	≤20min
提取时间(离心)	≤10min	≤15min	≤20min	≤15min	≤20min	≤25min	≤20min	≤15min	≤25min
洗脱体积	50~100μl	50~100μl		300μl		800μl	1.5ml~2.0ml	300μl	800μl
产量得率	100μg至200μg	200μg至300μg		500~800μg		2mg	1.5~2mg	500~800μg	2mg
内毒素指标EU/ug(简石™内毒专业去除试剂盒)	0.1EU/ug	0.05EU/ug		0.05EU/ug		0.1EU/ug		0.1EU/ug	

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
RNaseA溶液	TE1008-1	1ml	4°C
	TE1008-0.6	600µl	
	TE1008-0.3	300µl	
P1 (红色)	TD4200-1-30	30ml	4°C
	TD4200-1-150	150ml	
P2	TD4200-2-30	30ml	室温
	TD4200-2-150	150ml	
P3	TD4200-3-30	30ml	室温
	TD4200-3-150	150ml	
内毒素去除液	TD4200-8-80	80ml	4°C
	TD4200-8-200	200ml	
Endo-free质粒DNA洗涤液	TD4200-11-20	20ml	室温
无DNase / RNase 水	TW1001-5	5ml	室温
	TW1001-25	25ml	
5号PX纯化柱+15ml漏斗X	TC1082-2-N	2个/包	室温
	TC1082-5-N	5个/包	
6号内毒素去除柱+50ml漏斗	TC1044-2-N	2个/包	室温
	TC1044-10-N	10个/包	
50ml螺旋盖尖底离心管	JS-CT-109-4	4个/包	室温
	JS-CT-109-10	10个/包	
注射器内芯	TC1037-2	2个/包	室温
	TC1037-5	5个/包	
注射器外套 (含滤网)	TC1092-2	2个/包	室温
	TC1092-5	5个/包	