



无内毒素质粒小提中量快速提取试剂盒

说明书

产品型号: AP10L

品牌: RDland

一、产品组成

试剂盒组分	储存条件	50 次装	100 次装	200 次装
平衡液	室温	5 ml	10 ml	20 ml
RNase A	4°C	250 µl	500 µl	1 ml
溶液 P1	4°C	25 ml	50 ml	100 ml
溶液 P2	室温	25 ml	50 ml	100 ml
溶液 N3	室温	25 ml	50 ml	100 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml	32 ml	64 ml
		首次使用前按瓶身标签添加无水乙醇		
内毒素清除	4°C	10 ml	20 ml	40 ml
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml	50 ml
		首次使用前按瓶身标签添加无水乙醇		
洗脱缓冲液	室温	10 ml	20 ml	40 ml
吸附柱 AC	室温	50 个	100 个	200 个
2ml 收集管	室温	50 个	100 个	200 个

二、储存与稳定性

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°C 可以保存 12 个月;

1、RNase A 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输, 收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, 长期保存放-20°C;

2、第一次使用时, 可将试剂盒所带全部的 RNase A 加入溶液 P1 后置于 4°C 可保存 3 个月



左右。如果溶液 P1 中 RNase A 时间较久失活了, 提取的质粒可能有微量 RNA 残留, 在溶液 P1 中补加 RNase A 即可;

3、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 水浴加热几分钟恢复澄清, 重新混匀, 不要剧烈摇晃, 以免形成过量的泡沫。

三、产品介绍

本试剂盒沿用成熟高产 SDS 碱裂解体系, 质粒产出相较普通试剂盒提升 1-2 倍; 结合改良硅胶膜特异性吸附质粒, 配套分层除杂体系高效去除菌体蛋白、核酸杂质, 搭配专属内毒素清除体系, 将 DNA 内毒素含量控制在 <0.1 EU/µg。

无需苯酚、氯仿等强毒性有机试剂, 无需异丙醇 / 乙醇沉淀纯化, 操作简便快速, 单次可处理 5-15 mL 大肠杆菌 LB 过夜菌液, 稳定获得 30-90 µg 高拷贝高纯质粒 DNA。

适配下游全部分子实验: 菌落转化、PCR 扩增、限制性酶切、基因测序、体外转录; 低内毒素特性可直接用于原生质体分离、哺乳动物真核细胞转染、原代细胞转染等严苛实验场景。

四、产品核心优势

离心吸附柱内硅胶膜全部采用特制吸附膜, 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。

独有的去蛋白液配方, 可以高效去除残留的核酸酶, 即使是核酸酶含量丰富的菌株如 JM 系列、HB101 也可以轻松去除。有效防止质粒被核酸酶降解。

不需要使用有毒的苯酚、氯仿等试剂, 也不需要乙醇沉淀。快速、方便, 从 5-15 ml 大肠杆菌 LB (Luria-Bertani) 培养液中, 可快速提取 30-90 µg 纯净的高拷贝质粒 DNA。

独特工艺配方清除内毒素, 内毒素含量极低 (<0.1 EU/µg 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。

五、通用注意事项

1、无特殊标注时, 全部离心操作室温进行, 台式离心机最高转速 12,000 rpm;

2、质粒产量受菌液 OD 值、质粒拷贝数影响; 低拷贝 / 超大质粒需增加菌体, 同比例提升 P1/P2/N3 添加量;

3、质粒纯度与浓度检测: 紫外分光光度计 OD₂₆₀=1 对应 50 µg/mL DNA; 琼脂糖电泳可出现 1-3 条条带, 为超螺旋、开环、线性质粒不同构象, 属正常现象; 本试剂盒规范操作超螺旋占比超 90%;

4、环状超螺旋质粒电泳迁移速率无固定对应分子量，质粒精确大小必须酶切线性化后与 DNA Marker 对比判定。

六、标准操作步骤

1、菌体收集：取 5 - 15 mL 过夜 LB 菌液，9,000 rpm 离心 1 - 2 min，彻底弃净全部上清，沉淀转入 2 mL 离心管，加入 500 μ L P1，充分涡旋至无肉眼可见菌块。

提示：菌体未完全重悬会裂解不完全，大幅降低质粒产量与纯度。

2、菌体裂解：加入 500 μ L P2，轻柔上下颠倒 6 - 8 次，室温静置 4 - 5 min；溶液应清亮粘稠，若持续浑浊代表菌体过量，需减少菌液用量；全程禁止剧烈震荡，防止基因组 DNA 断裂，裂解总时长不可超过 5 min。

3、中和除蛋白：加入 500 μ L N3，立即轻柔颠倒 6 - 8 次混匀，出现白色絮状沉淀；12,000 rpm 离心 10 min，小心吸取上层澄清上清，避开表层白色沉淀浮沫；少量沉淀混入不影响最终纯度，后续洗涤步骤可去除。

4、吸附柱平衡：吸附柱 AC 内添加 100 μ L 平衡液，12,000 rpm 离心 1 min，弃废液，平衡柱现配现用。

5、内毒素初步去除：取上清，加入上清总体积 10% (0.1 倍) 内毒素清除剂，颠倒充分混匀。

6、质粒结合：加入上清 0.5 倍体积异丙醇混匀，分次上柱，单次上样不超过 750 μ L；12,000 rpm 离心 30 s，弃全部废液，直至所有混合液过柱。

7、可选去蛋白步骤（按需操作）

添加 500 μ L PE（确认已加无水乙醇），12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

适用场景：JM、HB101 等高核酸酶菌株；DH5 α 、Top10、XL-1 Blue 等 endA 缺陷型菌株可省略。

8、双次漂洗：每次添加 600 μ L WB（确认加无水乙醇），12,000 rpm 离心 15 s 弃滤液，重复漂洗 1 次。

9、将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10、取出吸附柱，放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 100 μ L-200 μ L 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 80°C-100°C 水浴中预热可提高产量），室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，弃吸附柱。

▲ 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 min，12,000 rpm 离心 1 min。洗脱两遍可提高浓度约 10%。

▲ 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 60 μ L）。

七、增强型深度除内毒素步骤

1、适用于原代细胞、干细胞、转染难度高的细胞系，在标准步骤 5 后执行：

加入 0.1 倍体积内毒素清除剂混匀后，置于冰浴 / 冷冻室 5 min，期间颠倒混匀 1 次，体系由浑

浊转为清亮（轻微浑浊不影响）；

2、室温放置 3 - 5 min，溶液再次分层浑浊；低温环境可 37 - 42°C 水浴加速分层，颠倒混匀；

3、12,000 rpm 室温离心 10 min 分层，上层水相含质粒 DNA，下层蓝色油相富集内毒素与杂质；小心转移上层水相至新离心管，严禁吸取底层蓝色油状物；

4、水相中加入 0.5 倍体积异丙醇混匀，后续从标准步骤 6（质粒上柱）开始完成全部提取操作。