

EasyPure® 1-Tube Universal EndoFree Plasmid MaxiPrep Kit (for 100-500 ml) 一管式通用型无内毒素质粒大提试剂盒(100-500 ml)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: EM152

版本号: Version 1.1

保存: 试剂盒在15°C-30°C温度下保存一年。

产品说明

本产品为通用型柱法质粒大提试剂盒。通过优化的裂解体系对大肠杆菌细胞进行裂解使其高效释放出质粒DNA。经硅胶膜离心柱特异性地吸附DNA, 可实现100-500ml LB培养基制备的大肠杆菌菌体的一管式裂解中和, 上清液体积小于50 ml。溶液含指示剂, 通过溶液颜色的变化, 指示裂解、中和是否完全, 实现操作的可视化。使用本试剂盒提取的质粒DNA适用于酶切、连接、转化、测序和转染等实验。

特点

- 一管式: 单支50 ml离心管内即可完成单次100-500 ml菌体的裂解中和, 无需准备大容积耗材。
- 可视化: 溶液LB II (蓝色), 通过颜色的变化, 指示裂解、中和是否完全, 保证质粒提取质量。
- 速度快: 通用型体系兼容100-500 ml菌液量提取。小体积配合大离心柱, 大幅降低离心次数, 节省操作时间。
- 产量高: 纯化柱核酸载量高达5 mg。

自备试剂设备

异丙醇 (分析纯), 无水乙醇 (分析纯), 高速离心机, 恒温水浴锅, 50 ml离心管

试剂盒组成

Component	EM152-01 (10 rxns)
Resuspension Buffer II (RB II)	140 ml
Lysis Buffer II (LB II, Blue)	70 ml×2
Neutralization Buffer II (NB II)	140 ml
Activation Buffer II (AB II)	55 ml
Wash Buffer II (WB II)	25 ml
Elution Buffer (EB)	60 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.4 ml
Maxi-Plasmid Spin Column with Collection Tube	10 each
Push Filter	10 each
50 ml Collection Tube	10 each

操作步骤

使用前, 将RNase A全部加入RB II中, 2-8°C保存; 加100 ml无水乙醇到WB II。

- 1、取100-500 ml过夜培养14-16小时LB Media制备的菌液 ($OD_{600} \leq 3.0$) 10,000×g离心3分钟, 弃上清收集菌体。
(低拷贝质粒或大于15 kb质粒推荐最小菌液量为200 ml/次。最高样本量上限详见下表)

样本量 上限	菌泥	菌液				
	质量	$OD_{600} \times V$ (体积, ml)	$OD_{600}=2$	$OD_{600}=3$	$OD_{600}=4$	$OD_{600}=5$
	2.0 g	1500	750 ml	500 ml	375 ml	300 ml

- 2、柱激活: 向Maxi-Plasmid Spin Column with Collection Tube离心柱膜中央加入5 ml柱激活溶液AB II, 室温下静置2分钟, 8,000×g离心1分钟, 弃流出液后静置备用。(激活后的离心柱须于1小时内尽快使用)



- 3、加入12 ml无色溶液RB II (**使用前请确认已加入RNase A**) , 充分振荡悬浮菌体, 使细菌细胞彻底混匀, 不应留有小的菌块, 请将重悬后的菌体单独置于50ml离心管中以便后续实验操作。
- 4、加入12 ml**蓝色**溶液LB II, 立即温和地上下翻转混合15-20次直至形成均匀的蓝绿色透亮的溶液 (**当菌体较多时可适当增加颠倒混匀次数**) , 室温下静置使菌体充分裂解5分钟。
- 5、向步骤4裂解产物中加入12 ml溶液NB II, 颠倒混合数次, 至管内颜色由蓝绿色彻底转变为无色, 并形成分散的蛋花状凝集块指示中和完全, 室温静置2分钟。
- 6、10,000×g离心15分钟 (**菌体较多可适当延长离心时间**) , 小心避开沉淀, 将上清倒入Push Filter 并推滤至全新的50 ml 离心管 (**自备**) 中。 (**请缓慢拔起推杆以免滤片松动影响推滤效果**)
- 7、向其中加入0.3倍体积的异丙醇, 颠倒混匀。将液体分3次转入离心柱, 每次8,000×g离心1分钟, 弃流出液, 至全部液体通过离心柱。 (**建议单次离心体积不超过17 ml, 液体高度不宜超过“△MAX△”刻线**)
- 8、加入5 ml 溶液WB II, 8,000×g离心1分钟, 弃流出液。
- 9、重复步骤8一次。
- 10、8,000×g离心3分钟, 彻底去除柱上残留的WB II。将离心柱置于新的50 ml Collection Tube 中, 离心柱开盖室温放置10-15分钟, 使乙醇挥发干净。
- 11、在离心柱的中央滴加1-5 ml EB或去离子水 (**7.0 < pH < 8.5**) 室温静置5分钟。 (**EB或去离子水在60-70℃水浴预热后使用效果更好**) 为达到更好洗脱效果可参考以下洗脱方案 (可根据实际情况自行调整洗脱体积) :

	高拷贝		低拷贝	
	100 ml≤菌液≤300 ml	300 ml < 菌液≤500 ml	100 ml≤菌液≤300 ml	300 ml < 菌液≤500 ml
	(0.4 g≤菌泥≤1.2 g)	(1.2 g < 菌泥≤2.0 g)	(0.4 g≤菌泥≤1.2 g)	(1.2 g < 菌泥≤2.0 g)
洗脱体积	1-3 ml	3-5 ml	1-2 ml	1-3 ml

- 12、8,000×g离心2分钟, 洗脱DNA。 (**首次洗脱回收率约60%-70%, 为增加质粒DNA回收率, 可将洗脱液重新加到离心柱中央静置5 min重复本步骤**)
- 13、洗脱出的DNA于-20℃保存。

为了得到高浓度的质粒, 可选择浓缩DNA操作。

- 1、转移洗脱液于离心管中, 加入1/10 体积的NB II, 7/10体积的异丙醇 (室温) , 混匀, 室温静置5分钟。
- 2、12,000×g 离心10 分钟, 小心弃掉上清 (若沉淀贴壁不紧, 可延长离心时间) 。
- 3、加1 ml室温70%乙醇, 12,000×g离心10分钟, 小心弃掉上清, 再短暂离心, 吸尽残液。
- 4、干燥沉淀5-10分钟, 加入适当体积的EB溶解沉淀。

注意事项

- 加入LB II后和NB II后, 操作一定要温和, 剧烈混合会导致基因组污染。
- 使用时, 将试剂盒携带的RNase A 全部加入到RB II溶液中, 混合均匀, 2-8℃保存。
- 裂解液LB II和柱激活液AB II, 如有混浊, 可在37℃水浴中加热溶解。且使用后立即旋紧盖子, 以免pH 发生变化。
- 建议严格控制投入的菌量。当提取LB Media制备的菌液时, $OD_{600} \times V$ 值超过1500或菌泥质量超过2.0 g将导致裂解和内毒素去除不充分, 影响质粒DNA的得率及纯度。当提取TB Media或2×YT Media等丰富培养基制备的菌液时应适当降低菌液量。
- 洗脱体积不宜小于1 ml, 过小的洗脱体积将影响洗脱效率。
- 建议通过琼脂糖凝胶电泳检测提取后的质粒DNA质量 (有无RNA、基因组DNA残留, 质粒超螺旋构象占比) 。RNA或基因组DNA等杂质的残留将导致NanoDrop读值严重虚高, 直接影响质粒浓度定量准确性与下游实验的成功率。

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1.1-202503

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

