

# EasyPure® EndoFree Pro Plasmid MaxiPrep Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: EM123

版本号: Version 2.1

保存: 试剂盒在室温 (15-25°C) 干燥条件下保存一年。

## 产品说明

本试剂盒采用改良的碱裂解法裂解大肠杆菌细胞, 利用硅胶膜离心柱特异地吸附DNA, 适用于从≤500 ml LB培养基培养的大肠杆菌细胞中高效地提取质粒DNA。溶液包含指示剂, 通过颜色的变化, 指示裂解、中和是否完全, 从而保证质粒提取的质量, 实现操作的可视化; 通过独特的内毒素清除剂纯化质粒, 内毒素水平可低于0.1 EU/μg。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

- 操作可视化: 溶液LB (蓝色), 通过颜色的变化, 指示裂解、中和是否完全, 从而保证质粒提取的质量。
- 快速: 1小时之内完成提取。
- 纯度高: 可制备高纯度、无内毒素 (< 0.1EU/μg) 转染级质粒DNA。
- 提取量高 (纯化柱核酸载量高达4 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 (本试剂盒反应次数10次以100 ml-200 ml LB Media菌液为一次反应计算)

Component	EM123-01 (10 rxns)
Resuspension Buffer (RB)	120 ml
Lysis Buffer (LB, Blue)	120 ml
Neutralization Buffer 1 (NB1)	120 ml
Activation Buffer (AB)	55 ml
Endotoxin Removal Buffer (ER)	36 ml
Wash Buffer (WB)	25 ml
Elution Buffer (EB)	25 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.2 ml
Maxi-Plasmid Spin Column with Collection Tube	10 each
Push Filter	10 each
50 ml Collection Tube	10 each

## 操作步骤 (以100~200 ml LB Media培养的菌液为例)

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

- 1、取100 ml-200 ml过夜培养14-16小时的菌液 ( $OD_{600} \approx 3.0$ ) 8,000×g离心4分钟, 弃上清。(对于低拷贝质粒可以适当增大菌液体积以获得更优提取效果)
- 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, 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10 ml无色溶液RB (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。
- 4、加入10 ml蓝色溶液LB, 温和地上下翻转混合5-8次 (剧烈震荡将导致基因组DNA污染), 使菌体充分裂解, 形成蓝色透亮的溶液, 颜色由半透亮变为透亮蓝色, 指示完全裂解 (不宜超过5分钟)。
- 5、向步骤4裂解产物中加入10 ml溶液NB1, 轻柔混合6-8次 (上清液颜色由蓝色转变为无色, 指示中和完全), 直至形成紧实的凝集块, 冰浴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、向上清液中加入3 ml橙色溶液 ER颠倒混匀5次至形成橙色悬液。
- 8、向其中加入0.3倍滤液体积的异丙醇，颠倒混匀。将液体分多次转入离心柱，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，可以多次离心避免洒漏）
- 9、加入5 ml 溶液WB，8,000×g离心1分钟，弃流出液。
- 10、重复步骤9一次。
- 11、8,000×g离心3分钟，彻底去除残留的WB。将离心柱置于新的50 ml Collection Tube 中，离心柱开盖室温放置5分钟，使乙醇挥发干净。
- 12、在离心柱的中央滴加1-2 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°C水浴预热后使用效果更好）。
- 13、8,000×g离心2分钟，洗脱DNA。（为增加质粒DNA回收率，可将洗脱液重新加到离心柱中央重复本步骤）
- 14、洗脱出的DNA于-20°C保存。

### 为了得到高浓度的质粒,可选择浓缩DNA。

- 1、转移洗脱液于离心管中，加入1/10 体积的NB1，7/10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

- 所有离心均在室温下进行。
- 加入LB或NB1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溶液中，混合均匀，2-8°C保存。
- 检查LB是否混浊，如有混浊，可在37°C水浴中加热几分钟，使其彻底溶解。且使用后立即盖紧盖子，以免pH 发生变化。
- 为了获得更高质量的质粒，建议严格控制输入的菌量，RB、LB、NB1和ER的用量请严格参照下表；当菌液OD<sub>600</sub>超过4.0或菌体量过大时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，请按同比例增加RB、LB、NB1、ER用量。如试剂量不足可单独选购RB、LB、NB1、ER、RNase A (10 mg/ml)溶液组合，详见附录（目录号：EM123-00）

LB Media	RB	LB	NB1	ER
< 100 ml	5 ml	5 ml	5 ml	1.5 ml
100 ml-200 ml	10 ml	10 ml	10 ml	3 ml
200 ml-300 ml	15 ml	15 ml	15 ml	4.5 ml
300 ml-400 ml	20 ml	20 ml	20 ml	6 ml
400 ml-500 ml	25 ml	25 ml	25 ml	7.5 ml

- 洗脱体积不宜小于1 ml，过小的洗脱体积将影响洗脱效率。
- 提取后的质粒DNA建议通过琼脂糖凝胶电泳检测提取质量（有无RNA、基因组DNA残留，质粒超螺旋构象占比）。RNA或基因组DNA的残留将导致质粒浓度值虚高，影响定量准确性与下游应用。
- 当提取低拷贝质粒和 > 10 kb大质粒时建议增大菌液投入量以获得更好的质粒DNA产量。
- **可选操作步骤**:如需获得内毒素水平更低的质粒DNA，可将步骤7中的橙色悬液冰浴10分钟，随后转入60°C水浴5分钟，8,000×g常温离心4分钟，使用移液器吸头贴管壁吸弃上层橙色油相。



## 附录

Component	EM123-00
Resuspension Buffer (RB)	120 ml
Lysis Buffer (LB, Blue)	120 ml
Neutralization Buffer 1 (NB1)	120 ml
Endotoxin Removal Buffer (ER)	36 ml
RNase A (10 mg/ml)	1.2 ml

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.1-202405

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 [complaints@transgen.com](mailto:complaints@transgen.com)

