

# EasyPure<sup>®</sup> EndoFree Plasmid MiniPrep Pro Kit

## 无内毒素质粒小提中量试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: EM112

版本号: Version 1.0

保存: 试剂盒在15°C-30°C温度下保存18个月。

### 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5 ml-15 ml 大肠杆菌菌液中高效提取质粒DNA。裂解液包含指示剂, 通过颜色的变化, 指示裂解、中和是否完全, 实现操作的可视化。全新内毒素去除方案可使内毒素水平低于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, 保证质粒提取质量。
- 快速: 1小时内完成提取。
- 纯度高: 可制备高纯度质粒DNA、无RNA残留。
- 无内毒: 内毒素 < 0.1 EU/μg, 制备转染级质粒DNA。
- 提取量高: 纯化柱核酸载量高达700 μg。

### 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, 2 ml离心管

试剂盒组成 (本试剂盒反应次数以5 ml-15 ml LB Media菌液为一次反应计算)

Component	EM112-01 (50 rxns)	EM112-02 (200 rxns)
Resuspension Buffer IV (RB-IV)	30 ml	120 ml
Lysis Buffer IV (LB-IV, Blue)	30 ml	120 ml
Neutralization Buffer IV (NB-IV)	24 ml	96 ml
Activation Buffer IV (AB-IV)	30 ml	120 ml
Endotoxin Removal Buffer IV (ER-IV)	8 ml	32 ml
Wash Buffer IV (WB-IV)	15 ml	3×20 ml
Elution Buffer (EB)	11 ml	44 ml
RNase A (10 mg/ml)	0.3 ml	1.2 ml
Mini-Plasmid Spin Column with Collection Tubes II	50 each	200 each

操作步骤 (以5 ml-15 ml LB Media培养的菌液为例)

使用前, 将RNase A全部加入RB-IV中, 2-8°C保存; 按下表分别加入相应体积的无水乙醇 (自备) 至WB-IV中。

Component	EM112-01 (50 rxns)	EM112-02 (200 rxns)
Wash Buffer IV (WB-IV)	60 ml	3×80 ml

- 1、取5ml- 15ml过夜培养14-16小时的菌液 (OD<sub>600</sub>≈3.0) 12,000×g离心1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Mini-Plasmid Spin Column with Collection Tubes II离心柱膜中央加入500 μl柱激活溶液AB-IV, 12,000×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500  $\mu$ l无色溶液RB-IV（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500  $\mu$ l蓝色溶液LB-IV，温和地上下翻转混合8-10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400  $\mu$ l溶液NB-IV，快速混合8-10次（**上清液颜色由蓝色转变为无色，指示中和完全。如蓝色转变较慢，可适当提高混匀速度**）直至形成紧实的凝集块，室温静置3分钟。
- 6、12,000 $\times$ g离心10分钟（**菌体较多可适当延长离心时间**），小心避开沉淀，将上清转移至新的2 ml离心管（自备）。
- 7、向上清液中加入100  $\mu$ l橙色溶液ER-IV，颠倒混匀5次至形成橙色悬液。
- 8、向橙色悬液中加入0.3倍体积的异丙醇（**过量异丙醇将导致RNA残留**），颠倒混匀。将液体分多次转入离心柱，每次12,000 $\times$ 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700 $\mu$ l，避免洒漏**）
- 9、加入600  $\mu$ l溶液WB-IV（使用前请确认已加入无水乙醇），12,000 $\times$ g离心1分钟，弃流出液。
- 10、重复步骤9一次。
- 11、12,000 $\times$ g离心2分钟，彻底去除残留的WB-IV。将离心柱置于新的1.5 ml或2 ml离心管中，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70  $\mu$ l-200  $\mu$ l EB或去离子水（7.0 < pH < 8.5）室温静置2分钟（EB或去离子水在60-70 $^{\circ}$ C水浴预热后使用效果更好）。
- 13、12,000 $\times$ 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 $^{\circ}$ C保存。

### 注意事项

- 所有离心均在室温下进行。
- 加入LB-IV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-IV溶液中，混合均匀，2-8 $^{\circ}$ C保存。
- 检查LB-IV是否混浊，如有混浊，可在37 $^{\circ}$ C水浴中加热，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体量，RB-IV、LB-IV、NB-IV和ER-IV的用量请严格参照下表；当菌液OD600超过3.0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，请按下表同比例增加RB-IV、LB-IV、NB-IV、ER-IV用量。
- （当样本为TB或2 $\times$ YT等丰富型培养基制备的菌液时，菌液浓度较高，请在下表基础上适当增大对应的试剂用量。）

菌液量	试剂推荐用量			
	RB-IV	LB-IV	NB-IV	ER-IV
OD600 $\approx$ 3.0				
5 ml-15 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.4 ml	0.1 ml
15 ml-30 ml	1.0 ml	1.0 ml	0.8 ml	0.2 ml
30 ml-45 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.2 ml	0.3 ml
45 ml-60 ml	2.0 ml	2.0 ml	1.6 ml	0.4 ml

- 洗脱体积不宜小于70  $\mu$ l，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。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202603

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

