

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

使用前请仔细阅读说明书

目录号: EM153

版本号: Version 1.0

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100-500 ml 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。全新内毒素去除方案可使内毒素水平低至0.001 EU/μg, 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 III (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。
- 无内毒: 纯化所得质粒内毒素可低于0.1 EU/μg, 最低可至0.001 EU/μg。
- 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	EM153-01 (10 rxns)
Resuspension Buffer III (RB III)	140 ml
Lysis Buffer III (LB III, Blue)	70 ml×2
Neutralization Buffer III (NB III)	100 ml
Activation Buffer III (AB III)	55 ml
Wash Buffer III (WB III)	25 ml
Endotoxin Removal Buffer III (ER III)	40 ml
ToxinOut Buffer III (TB III)	110 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 III中, 2-8°C保存; 加100 ml无水乙醇到WB III。

- 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 *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

- 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 III，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)
- 加入12 ml无色溶液RB III (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50 ml离心管中以便后续实验操作。
- 加入12 ml蓝色溶液LB III，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。
- 向步骤4裂解产物中加入8 ml溶液NB III，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。
- 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)
- 向上清液中加入3 ml橙色溶液ER III颠倒混匀5次至形成橙色悬液。
- 向其中加入0.3倍体积的异丙醇，颠倒混匀，至液体转变为澄清透明状态。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△”刻度线)
- 加入10 ml溶液TB III，8,000×g离心1分钟，弃流出液。
- 加入10 ml溶液WB III，8,000×g离心1分钟，弃流出液。
- 8,000×g离心3分钟，彻底去除柱上残留的WB III。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。
- 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°C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

- 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)
- 洗脱出的DNA于-20°C保存。

为得到更高浓度，且更低内毒素残留的质粒，请选择如下操作：

- 转移洗脱液于离心管中，加入1/10体积的NB III混匀。
- 加入1/10体积的ER III，充分混匀至橙色悬液，冰浴10分钟，其间颠倒混匀3次，室温12,000×g离心10分钟，转移上清至新的无酶无菌离心管。
- 加入液体7/10体积的异丙醇(室温)，充分混匀，室温静置5分钟。
- 室温12,000×g离心10分钟，小心弃掉上清(如沉淀贴壁不紧实，可延长离心时间)。
- 加入1 ml 70%乙醇，室温12,000×g离心10分钟，小心弃掉上清。
- 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 III、NB III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 III溶液中，混合均匀，2-8℃保存。
- 裂解液LB III和柱激活液AB III，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。





品质高于一切
精品服务客户

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202503

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

北京全式金生物技术股份有限公司

www.transgen.com

trans@transgen.com

+86-400 898 0321

北京市海淀区中关村东升国际科学园4号楼

