

Quick-Start Protocol

Ver: 2203

**EZgene™ EndoFree Plasmid ezFlow Maxiprep Kit**
**无内毒素快速质粒大量提取试剂盒 (柱式法)**
**(BW-PD1520)**

### 产品简介

本试剂盒采用特殊的缓冲液体系和专利的 DNA 结合系统,可以快速地从小于 200 mL 大肠杆菌培养液中获得高达 1200 µg 的质粒 DNA。纯化后的质粒 DNA 无胍盐或阴离子交换树脂残留,内毒素水平低至 1-10 EU/µg 质粒 DNA。可用于内毒素敏感细胞系、原代培养细胞的转染或显微注射等下游应用。

### 试剂盒组成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Maxi Column	2	10	25
50 mL Collection Tube	2	10	25
Buffer A1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer B1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer N3	10 mL	40 mL	90 mL
Buffer RET	22 mL	110 mL	270 mL
DNA Wash Buffer*	5 mL	24 mL	54 mL
EndoFreeElution Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
RNase A (20 mg/mL)	110 µL	550 µL	1.35 mL
User Manual	1	1	1

**注:** 本试剂盒提供的溶液量按照处理 200 mL OD<sub>600</sub> 介于 2.0-3.0 的高拷贝质粒菌液进行计算。若有额外需要,可联系倍沃进行购买。

### 产品贮存及稳定性

所有试剂及耗材 4-28°C 保存。

产品有效期自生产之日起 12 个月。

### 注意事项

- RNase A: 在 4-28°C 可稳定储存一年。使用前先瞬时离心,而后再加入 Buffer A1 中。加入 RNase A 的 Buffer A1 使用后应保存于 2-8°C。
- DNA Wash Buffer: 首次使用前请将 20 mL (PD1520-00) 或 96 mL (PD1520-01) 或 216 mL (PD1520-02) 无水乙醇加入 DNA Wash Buffer 瓶内。
- Buffer B1: 低温时可能会有沉淀析出,此时请于 37°C 水浴加热至沉淀完全溶解,溶液澄清。使用后尽快拧紧瓶盖。
- Buffer N3 低温时可能形成沉淀,使用前请于 37°C 水浴加热溶解。
- 确保离心机可能满足相对离心力 12,000×g。
- 所有离心操作需在室温下 (15-25°C) 进行。

### 实验前需准备的材料

- 无水乙醇
- 高速离心机或负压装置
- 50 mL 离心管

### 操作步骤 (离心法)

1. 从新鲜培养的选择性培养基上挑取单菌落,接种至含有适量抗生素的 1 mL LB 培养基内,37°C 震荡 (约 250 rpm) 培养 6-8 h。
2. 从中吸取 100 µL 新鲜培养的菌液,接种到 150-200 mL 含适量抗生素的 LB 培养基中,37°C 震荡培养 14-16 h。

**注:** 勿使用 4°C 保存的菌液或甘油菌作为初始菌液。菌液体积不要超过 200 mL,否则请增加对应 Buffer 的使用量。

3. 5,000 x g 离心 10 min, 弃上清,将管子倒置于纸巾上,去除残留培养基。
4. 加入 10 mL Buffer A1 (使用前加入 RNase A),用移液器或涡旋震荡仪充分悬浮细菌。充分重悬对于获得最佳产量至关重要。
5. 加入 10 mL Buffer B1,轻轻反转 5-10 次以混匀 (不要涡旋)。如有必要,可以继续颠倒混匀至溶液变得稍微澄清。室温静置 5 min 直至获得澄清的裂解液。
6. 加入 3 mL Buffer N3,立即反转混匀 5-10 次,转移裂解液至高速离心管,12,000×g 离心 10 min。

**注:** 若反转混合后混合物仍然呈团块、褐色、粘稠状,需继续混合均匀以确保溶液完全中和。若菌液 RNA 量较多,可静置 10 min 使 RNA 酶充分发挥作用。若没有高速离心机,可使用 Filter Syringe (BW-PD1522 试剂盒提供,或向倍沃单独购买) 过滤裂解液。

7. 小心将 **20 mL 上清液** 转移至一个干净的 50 mL 离心管中（避免吸到沉淀），加入 **10 mL 的 Buffer RET** 和 **10 mL 无水乙醇**，手动剧烈震荡 **5 次** 混匀。

**注：**增加 Buffer RET 的使用量可减少质粒 DNA 内毒素的水平，然而 DNA 的得率可能会受到影响。可依据下游实验来调节 Buffer RET 的使用量。

8. 转移 **18 mL 混合液** 至 **Maxi Column, 8,000×g** 离心 **1 min**。弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。重复此步骤直至所有混合液通过 **Maxi Column**。

**注：**若 50 mL Collection Tube 与离心机转子不匹配（例如，转子盖子不能盖住），可通过台式离心机  $>2,500\times g$  离心 5 min。

9. 加入 **10 mL DNA Wash Buffer**（确保已加入指定体积的无水乙醇），**8,000×g** 离心 **1 min**；弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。

10. 加入 **10 mL 无水乙醇**，**8,000×g** 离心 **1 min**；弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。

11. 打开柱盖，**10,000×g** 离心 **10 min**，以去除残留乙醇，获得最佳洗脱。离心后可以将柱子放入烘箱 **50-60°C** 加热 **10 min** 以利于更好地去除乙醇并增加洗脱效率。**注：**若离心转速低于  $5,000\times g$ ，离心 20 min 以去除残留乙醇。

12. 将 **Maxi Column** 转移至一个干净的 **50 mL 离心管**，在膜中央加入 **1.5-2.0 mL**  $65^{\circ}\text{C}$  预热的 **Endofree Elution Buffer**，静置 **1 min**，**10,000×g** 离心 **5 min** 洗脱质粒 DNA。

13. 为提高质粒得率可将洗脱下来的液体重新上柱，室温静置 **1 min**，**10,000×g** 离心 **5 min** 进行二次洗脱。

14. **可选步骤：替代步骤 12**，为获得最佳质粒得率，可以加入 **4.0-5.0 mL**  $65^{\circ}\text{C}$  预热的 **Endofree Elution Buffer**，室温静置 **5 min**，**10,000 ×g** 离心 **5 min**；再将洗脱下来的液体二次上柱，以获得最大质粒产量。

**注：**如有需要，可以用异丙醇沉淀法对质粒进行浓缩：加入 0.1 倍体积的 3 M KAc 或 NaAc (pH5.2) 和 0.7 倍体积的异丙醇，混匀后最大速度离心 10 min，弃上清；加入 1 mL 70%乙醇洗涤质粒，最大速度离心 5 min，小心弃上清；室温干燥 20 min 去除残留乙醇；使用适量 Endofree Elution Buffer 重悬质粒 DNA。

纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验，如克隆/亚克隆、文库构建、体外翻译、测序、转染及显微注射等。

### 低拷贝质粒/柯斯质粒的纯化

从过夜培养的菌液中纯化低拷贝质粒的得率大约为  $0.1-1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。若要提取中、低拷贝数的质粒 DNA，请遵循以下准则：

- **培养体积：**使用高拷贝质粒 **2 倍体积** 的培养基进行细菌培养；至多使用 400 mL 菌液。
- **步骤 4-步骤 7：**使用 **2 倍体积** 的 Buffer A1、B1、N3、RET 以及无水乙醇。Buffer A1、B1、N3 和 RET 可单独向倍沃购买。
- 使用与高拷贝质粒菌 **相同体积** 的 DNA Wash Buffer 和 Endofree Elution Buffer。

### 常见问题解答

问题	可能原因	建议
得率低	裂解不完全	加入 Buffer B1 后充分混匀。 如果瓶盖没拧紧，重配 Buffer B1 (0.2 M NaOH 和 1% SDS)。
	菌液过度培养或不新鲜	菌液培养 12-16 h 为佳，若当天来不及纯化，将菌液离心后收集菌体 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。请勿将菌液置于 $4^{\circ}\text{C}$ 过夜。
	质粒拷贝数低	增加培养基和 Buffer A1、B1、N3、RET 和无水乙醇的体积。
没有质粒	质粒在宿主菌内丢失	重新准备新鲜的菌液。
基因组污染	加入 Buffer B1 后时间超过 5 min，或者震荡过于剧烈。	加入 Buffer B1 后不要剧烈震荡，孵育时间不要超过 5 min。
RNA 污染	RNase A 没有加入至 Buffer A1	在 Buffer A1 中加入 RNase A。
质粒电泳跑出点样孔	乙醇没有去除干净	洗脱前确保无乙醇残留。如果必要，可再次离心或烘干 Maxi Column。

