

FastPure Enhanced EndoFree Plasmid Maxi Plus Kit

DC222



使用说明书

Version 24.1

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	02
06/注意事项	03
07/实验原理与流程概要	03
08/实验流程	04
08-1/实验前准备	04
08-2/提取步骤	04
08-3/可选步骤	05
09/常见问题与解决方案	06

01/产品概述

本试剂盒适用于提取**100 - 200 ml**过夜培养的菌液，采用优化的碱裂解法裂解细胞，通过独特的漂洗液结合内毒素过滤去除技术快速有效地去除内毒素、蛋白等杂质，搭配超大量高效质粒结合吸附柱实现快速过柱，整个提取过程仅需50 min，方便快捷。添加指示剂的独特P2溶液，通过颜色的变化，指示裂解、中和是否充分，保证提取质量，实现可视化操作。提取的质粒DNA可适用于多种细胞的转染及各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

02/产品组分

	组分	DC222-01 (10 rxns)
BOX 1	■ RNase A Solution	500 µl
	Buffer QB	25 ml
	Buffer P1	100 ml
	Buffer P2	100 ml
	Buffer N3	100 ml
BOX 2	EndoFree - Buffer PW	75 ml
	Endotoxin-free Elution Buffer	25 ml
	Endotoxin Remover Filtration	2 × 5
	FastPure DNA Maxi Columns Plus	2 × 5
	50 ml Collection Tubes	2 × 5

RNase A Solution: 去除RNA。

Buffer QB: 平衡吸附柱。

Buffer P1: 悬浮细菌。

Buffer P2: 裂解细菌。

Buffer N3: 中和溶液。

EndoFree - Buffer PW: 无内毒素漂洗液，去除蛋白等杂质。

Endotoxin-free Elution Buffer: 洗脱质粒。

Endotoxin Remover Filtration: 过滤内毒素。

FastPure DNA Maxi Columns Plus: 吸附质粒。

50 ml Collection Tubes: 收集滤液。

03/保存条件

BOX 1: 2 ~ 8℃保存，根据不同目的地调整运输方式；

BOX 2: 15 ~ 25℃保存，室温运输。

04/适用范围

100 - 200 ml过夜培养的菌液。

05/自备材料

无水乙醇、异丙醇和50 ml无菌离心管等。

06/注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

1. 吸附柱15 ~ 25℃保存，长期保存建议置于2 ~ 8℃。
2. Buffer P1使用前请加入RNase A Solution (将试剂盒提供的RNase A Solution全部加入)，混匀后置于2 ~ 8℃保存，可稳定保存6个月。
3. 首次使用前按EndoFree - Buffer PW瓶身标签所示，加入相应体积的无水乙醇。
4. Buffer QB、Buffer P2低温易析出，使用前先检查是否有晶体析出，如有晶体析出，可置于37℃加热至完全溶解，冷却至室温后混匀使用。
5. 处理低拷贝质粒时，可适当增加菌液体积，并按比例扩大Buffer P1、Buffer P2和Buffer N3的用量。
6. 质粒DNA的产量和质量取决于质粒拷贝数、宿主菌株、接种量、培养基类型和抗生素等因素。
7. 请不要直接接触Buffer QB、Buffer P2、Buffer N3，使用时应佩戴乳胶手套，使用后应立即盖紧盖子。
8. 不同离心机有效离心半径不同，选择离心机离心转速时建议以离心力g/rcf为主。
9. 所有操作步骤，均在室温下进行。

07/实验原理与流程概要

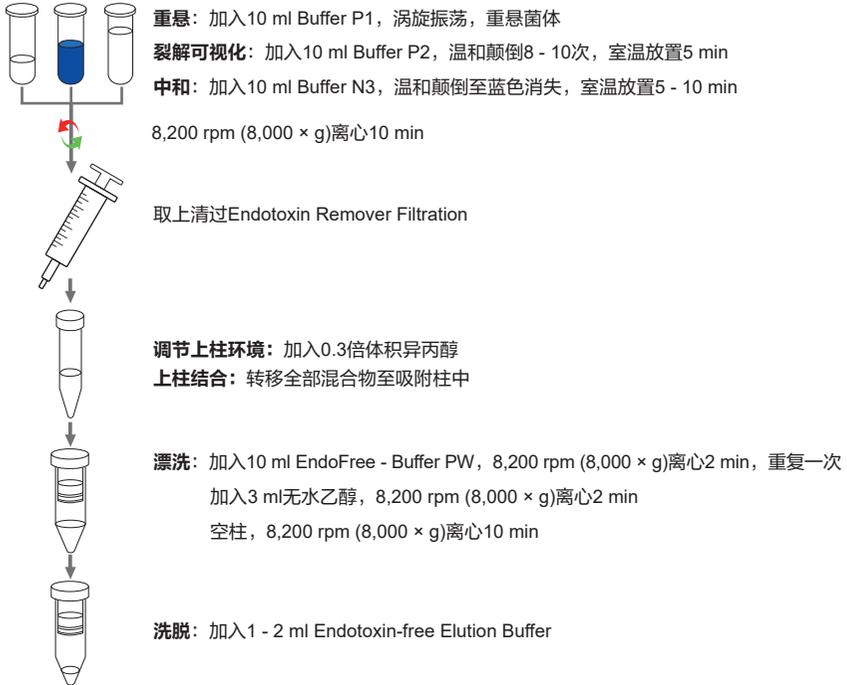


Fig 1. FastPure Enhanced EndoFree Plasmid Maxi Plus Kit提取流程

08/实验流程

08-1/实验前准备

1. Buffer P2低温($\leq 20^{\circ}\text{C}$)易析出, 室温 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 时需置于 37°C 加热10 min至完全溶解, 冷却至室温后混匀使用。
2. 由于受生长培养基(TB、CircleGrow、2XYT、SOC、LB等)、培养条件、宿主菌株或质粒插入物类型等的影响, 细菌培养物中最终的细胞数量会在很大的范围内变化。根据经验, 1 L大肠杆菌细胞培养物OD值600为1, 由 1×10^{12} 细胞组成, 将会产生约1.5 - 1.8 g细胞湿重。

Pellet wet weight	DC222裂解液体积推荐	菌液最大投入量			
		OD600 = 1	OD600 = 2	OD600 = 4	OD600 = 6
0.3 - 0.75 g	10 ml	400 ml	200 ml	100 ml	66 ml

▲ 以细胞培养物充分裂解为基准可调节裂解液体积。

08-2/提取步骤

1. 取100 - 200 ml过夜培养的菌液, 8,200 rpm ($8,000 \times g$)离心3 min收集菌体, 尽量吸除上清。
▲ 若以2XYT、TB等富集培养基进行菌体培养时, 由于菌体生长密度高, 需要适当增加裂解液体积保证充分裂解菌体。
2. 加入10 ml Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A Solution), 涡旋振荡直至完全重悬, 重悬液应呈现均质分散状态, 无明显菌体颗粒及团块。
▲ Buffer P1、Buffer P2、Buffer N3投入体积随菌液体积增加而同比例增加, 不区分菌体拷贝数。
▲ 菌体完全重悬后, 应立即进行后续操作, 否则会造成菌体沉淀成团, 裂解不充分, 影响提取性能。
3. 立即加入10 ml Buffer P2, 温和地上下颠倒混匀8 - 10次, 菌液此时呈现均质的蓝色透亮粘稠状态, 室温放置5 min。
▲ 此步应立即温和混匀, 不要剧烈振荡, 避免基因组DNA污染。此时菌液应变得清亮粘稠, 操作时间不应超过5 min, 避免质粒受到破坏。
▲ 若颠倒混匀后未变得清亮, 可能由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌液投入量。
4. 加入10 ml Buffer N3, 立即温和地上下颠倒10 - 12次, 彻底中和Buffer P2。此时蓝色溶液应被完全中和呈现无色, 絮状沉淀呈分散均匀状态, 室温静置5 - 10 min, 8,200 rpm ($8,000 \times g$)离心10 min。
▲ 若菌体投入超过220 OD (以OD600计算菌液投入量), 适当增加颠倒混匀的次数至15次, 有助于充分中和。Buffer N3加入后应立即温和颠倒混匀, 避免产生局部沉淀; 离心后上清应为澄清状, 温和操作及室温放置有助于质粒产量和质量提升。
5. 柱平衡: 将FastPure DNA Maxi Columns Plus置于50 ml Collection Tubes中。向吸附柱中加入2.5 ml Buffer QB, 8,200 rpm ($8,000 \times g$)离心2 min, 弃滤液。
▲ 用平衡液处理过的吸附柱最好立即使用, 放置时间过长会影响提取得率。
6. 将步骤4收集的上清液小心倒入Endotoxin Remover Filtration中(请避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器), 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在新的50 ml无菌离心管中(自备)。
7. 向转移后的上清溶液中(约28.5 ml)加入0.3倍滤液体积的异丙醇(约8.5 ml), 上下颠倒混匀4 - 6次。
▲ 异丙醇加入过多容易导致RNA残留, 请根据实际上清液体积加入异丙醇。

8. 转移步骤7中混合液至FastPure DNA Maxi Columns Plus中, 8,200 rpm (8,000 × g) 离心2 min, 弃滤液。
 - ▲ 吸附柱的最大容积为25 ml, 可分两次上柱。
9. 重复步骤8直至混合液全部上柱。
10. 沿吸附柱管口贴壁缓慢加入10 ml EndoFree - Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇) 至吸附柱中, 8,200 rpm (8,000 × g)离心2 min, 弃滤液。
11. 重复步骤10。
12. 加入3 ml无水乙醇至吸附柱中, 8,200 rpm (8,000 × g)离心2 min, 弃滤液。
13. 将吸附柱放回收集管中, 8,200 rpm (8,000 × g)离心10 min, 弃收集管。
14. 将吸附柱置于通风、清洁处, 室温晾干数分钟或65°C烘干吸附柱3 min, 以彻底干燥吸附柱去除乙醇残留, 将吸附柱置于50 ml Collection Tubes, 向吸附柱膜中央加入1 - 2 ml Endotoxin-free Elution Buffer。室温静置3 min, 8,200 rpm (8,000 × g)离心3 min, 弃吸附柱。
 - ▲ 若吸附柱有乙醇残留, 将会影响产物纯度及下游实验, 请注意彻底晾干乙醇。
 - ▲ 洗脱体积建议≥1 ml, 体积过小会降低洗脱效率。
 - ▲ 若使用ddH₂O洗脱, 应确保ddH₂O的pH在7.0 - 8.5范围内, pH低于7.0会降低洗脱效率。
 - ▲ 将洗脱液于65°C预热或二次洗脱, 可提高质粒的洗脱效率。
15. 提取的质粒DNA于-30 ~ -15°C保存。

08-3/可选步骤

如果需要更高浓度的质粒, 可进行如下操作:

1. 每1 ml洗脱产物加入等体积的异丙醇以及0.1倍体积的Buffer N3, 颠倒混匀, 室温放置5 min。8,200 rpm (8,000 × g)室温离心15 min, 小心弃上清。
2. 加入1 ml的70%乙醇洗涤沉淀, 室温8,200 rpm (8,000 × g)离心3 min, 小心弃去乙醇。
3. 重复操作步骤2。
4. 空气中干燥沉淀约5 - 10 min, 根据需要用适当体积的Endotoxin-free Elution Buffer溶解沉淀。
 - ▲ 离心转速8,200 rpm (8,000 × g) - 12,000 rpm (13,400 × g)均可。

09/常见问题与解决方案

常见问题	原因	解决方案
质粒DNA产量低	1. 低拷贝质粒	不同质粒载体因拷贝数差异会造成产量有明显的波动。对于低拷贝质粒应加大菌液使用量，同时按照比例增加Buffer P1、Buffer P2和Buffer N3的用量。洗脱液应65℃预热，以增加洗脱效率。低拷贝质粒例如：pET系列，pWE15，SuperCos，pBR322，pACYC及其衍生载体，pSC101及其衍生载体等
	2. 大片段质粒(>10 kb)	洗脱液应65℃预热，以增加洗脱效率
	3. 宿主菌株差异	不同宿主对质粒产量也会产生影响。建议使用end A大肠杆菌菌株，如DH5α、TOP10及XL10等
	4. Buffer P2析出	Buffer P2低温时易析出，37℃加热至完全溶解，混匀后使用
	5. 菌液保存不当	甘油菌种保存过程中存在质粒丢失现象，建议培养细菌前先划线或涂布平板活化菌种，以稳定产量
	6. 菌液培养时间过长	细菌的培养时间不要超过16 h，发生溶菌将降低质粒质量，最好控制在13 - 15 h
基因组污染	1. 裂解操作不当	加入Buffer P2后，必须温和颠倒混匀；处理多个样本时，裂解时间不要超过5 min
纯度低	1. 盐离子残留	建议沿吸附柱管壁四周加入漂洗液，有助于减少盐离子残留
	2. 乙醇残留	空离后可室温开盖放置10 min，最大程度去除乙醇残留
RNA残留	1. RNase A活性下降	已加入RNase A的Buffer P1长时间室温放置可能会出现酶活下降，使用后应及时放回2 ~ 8℃
	2. 菌液体积过高	由于菌体数量过多，导致Buffer P1中RNase A不足以消化菌体中的RNA，建议减少菌液体积
	3. 异丙醇加入过多	根据离心后上清液的实际体积加入0.3倍滤液体积异丙醇
	4. 中和静置时间过长	按照说明书指示静置时间进行放置



Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: +86-400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

