

# Geneaid™ Plasmid Maxi Kit 无内毒素质粒大提试剂盒

仅供科研使用

产品编号

PME02, PME10, PME25

完整说明书(英文)下载

如果您是第一次使用本产品或对本产品的操作步骤不熟悉, 请您经由扫描QR code下载并详阅完整说明书。

Geneaid



Instruction Manual Download

## 1. 菌体收集

根据培养菌体的浓度取200-800 ml (高拷贝质粒)或500-1600 ml (低拷贝质粒)过夜培养的菌液, 加入50 ml离心管或250 ml离心瓶中, 以 $\geq 3,000\times g$ 离心15分钟, 尽量吸除上清液(菌液较多时, 可多次离心并将菌体沉淀收集到一个离心管中)。注意: 若菌体沉淀湿重 $>3 g$ , 溶液PM1, 溶液PM2及溶液PM3体积需增加1.5倍。

## 2. 柱平衡

离心过程中, 向吸附柱Plasmid Maxi中(吸附柱放入50 ml收集管中)加入10 ml的溶液PEQ, 利用重力使溶液PEQ滴落, 待溶液PEQ完全从吸附柱滴落后, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中, 待步骤7使用。

## 3. 菌体悬浮

取10 ml溶液PM1(请先检查是否已加入RNase A), 加入另一50 ml离心管中。取100  $\mu$ l TrueBlue Lysis 试剂加入同一50 ml离心管中混匀。注意: TrueBlue Lysis试剂的加入对于后续PCR, 酶切和测序都没有影响。使用时按照TrueBlue Lysis试剂: 溶液PM1=1:100进行混合, 彻底颠倒混匀, 若有沉淀产生为正常现象。向留有菌体沉淀的离心管中加入上述溶液PM1, 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。注意: 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。

## 4. 细胞裂解

向离心管中加入10 ml溶液PM2, 温和地上下翻转10次使菌体充分裂解, 于室温下放置2分钟, 所用时间不应超过5分钟。注意: 加入溶液PM2后, 样品悬浮液会变成蓝色。若仍有部分样品悬浮液呈现无色, 继续翻转混合样品直到所有悬浮液呈现蓝色。

## 5. 中和

向离心管中加入10 ml溶液PM3, 立即温和地上下翻转10次, 充分混匀, 以 $\geq 3,000\times g$ 于室温离心20分钟。注意: 加入溶液PM3后将出现白色絮状沉淀, 样品悬浮液呈现无色。若仍有部分样品悬浮液呈现蓝色, 继续翻转混合样品直到所有悬浮液呈现无色。

## 6. 去除内毒素

将上一步收集的上清液转移到干净的50 ml收集管中, 注意尽量不要倒出沉淀。翻转溶液PER 3-5次使其充分混匀, 向上清液中加入3 ml溶液PER, 上下翻转5-10次使其充分混匀, 于冰上放置30分钟。

## 7. 吸附

将上一步的样品转移到经柱平衡步骤的吸附柱Plasmid Maxi中。利用重力使上清液滴落, 待上清液完全从吸附柱滴落后, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

## 8. 漂洗

向吸附柱Plasmid Maxi中加入30 ml的溶液PMC, 利用重力使溶液PMC滴落, 待溶液PMC完全从吸附柱滴落后, 倒掉收集管中的废液。

## 9. 洗脱

将吸附柱Plasmid Maxi放入干净的50 ml收集管中, 向吸附柱Plasmid Maxi中加入12 ml的溶液PEL, 利用重力使溶液PEL滴落, 待溶液PEL完全从吸附柱滴落至收集管中。

## 10. DNA沉淀

向收集管中加入9 ml的异丙醇(0.75倍滤液体积), 上下颠倒充分混匀, 以 $\geq 3,000\times g$ 于4°C离心20分钟, 轻轻倒掉上清液。向收集管中加入5 ml 75%乙醇充分漂洗沉淀, 以 $\geq 3,000\times g$ 于4°C离心5分钟, 轻轻倒掉上清液, 将其倒置在吸水纸上。将收集管敞口室温放置10分钟, 使乙醇充分挥发。待DNA沉淀完全干燥后, 加入500  $\mu$ l-2 ml洗脱缓冲液TE或ddH<sub>2</sub>O, 将收集管放置55-60°C水浴5-10分钟使DNA沉淀充分溶解。注意: 如果使用ddH<sub>2</sub>O做洗脱液, 需保证其pH值 $\geq 8.0$ , pH值低于8.0会降低洗脱效率。