

MaxPure Plasmid EF HC Kit

无内小柱大提试剂盒

本产品适合于从 100ml 细菌培养液中提取高浓度的低内毒素质粒 DNA。试剂盒采用独特的溶液体系和改良硅胶膜抽提体系，质粒产量可高达 1.5mg，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 3μg/μl。得到的质粒可直接用于细胞转染和动物注射等。

产品组份

产品编号	P1232-01	P1232-02	P1232-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	20 mg	90 mg
Buffer E1	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E2	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E3	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E4	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E5	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer TE	3 ml	15 ml	30 ml
Buffer ER2	1.8 ml	1.8 ml	6 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
MaxPure EF Mini Column C	2	10	50
2 ml Collection Tubes	2	10	50
50ml Centrifuge Tubes	2	10	50
Extender Tube	2	10	50
Support Tube	2	10	50

保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)放置于 -20~8℃。低温下，Buffer E2/E4 会有沉淀形成，55℃水浴使沉淀完全溶解后使用。

准备事项

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
- 加入 0.2~1.0ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 充分溶解，然后把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 中，于 2-8℃保存，有效期为 6 个月。

实验步骤

1. **将单克隆菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37℃摇床培养 6~8 小时进行小量扩增菌液。**

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单菌落接种于 1ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37℃摇床(200-300rpm)培养 6-8 小时。甘油保存菌种在保存过程可能会丢失载体，先划平板进行活化，用灭菌牙签挑取单菌落进行初步培养。

2. **在 500ml 培养瓶加入 50~100ml LB/抗生素培养液，接种 0.001 倍初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养 12-14 小时。**

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。培养过夜后可通过菌液密度或 OD600 来判断，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。2 × YT 或 TB 培养液中菌体生长速度过快，不利于质粒充分复制，应尽量避免使用。使用 YT 或 TB 培养液时，因菌体密度很高，建议不要超过 30ml。

3. **3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集 50~100ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**

4. **加入 5ml Buffer E1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。**

充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显的菌块，可以用移液器吸打难打散的团块。

5. **加入 5ml Buffer E2 至重悬液，温和地上下颠倒并转动离心管 10~15 次，室温静置 3 分钟，其间颠倒混匀 6-8 次。**

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的溶液而且透亮。涡旋会造成基因组污染。

6. **加入 5ml Buffer E3 至裂解液，上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液，3,000~5,000 rpm 离心 10 分钟。**

加入 Buffer E3 后应立即上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量达 100ml 时，属于高密度碱裂解类型，中和时会形成大块且紧密的沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，

并轻稍振荡让大块沉块团分散成较小的团块，让 Buffer E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第 6 步的上清液倒入过滤器中，把活塞插入过滤器，推动活塞使中和液过滤到 50ml 离心管(自配)中。
8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 (~4.5ml)，颠倒混匀 10-15 次或涡旋混匀 10 秒，按抽滤操作或离心操作。

离心操作

9. 把 Extender Tube 插到 MaxPure EF Mini Column C 中，并装在 Support Tube 中，最后再一起放到 50ml Centrifuge Tubes 中。
为防止混合液从 Extender Tubes 和 DNA 柱子的侧壁流出，把 Extender Tubes 用力插紧到柱子中，不要使用其它 50ml 离心管。当 Extender Tube, Column 和 Support Tubes 放到 50ml 离心管口有 2-3mm 突出，盖上盖子，用力下压并旋紧盖子。
10. 转移一半体积的混合液至柱子中，盖紧盖子（用力下压并旋盖），3,000 rpm 离心 3 分钟。
11. 倒弃废液，把柱子套回离心管中，把剩余的混合液转移至柱子中，盖上盖子（用力下压并旋盖）。3,000 rpm 离心 3 分钟。
12. 倒弃废液，把柱子套回离心管中。加入 2ml Buffer E5 至柱子中，3,000 rpm 离心 3 分钟。
13. 加入 6ml Buffer PV2 至柱子中，盖上盖子（用力下压并旋盖）。3,000 rpm 离心 3 分钟。
14. 去除延长管，支撑管和离心管。把柱子装到 2ml 收集管，13,000 x g 离心 3 分钟，按第 15 步进行洗脱。

抽滤操作

9. 把 MaxPure EF Mini Column C 插到真空抽滤盒接口处，把 Extender Tubes 插到 Column 中并用力插紧以防止渗液。
10. 把全部混合液（第 8 步）转移或倒入柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体全部过滤完毕后，关闭真空泵，让压力下降为零。
纯化大柱 FE5 一次最多能装 19ml，多余溶液分两次转入，当柱子有足够空间时，立即加入余下混合液，不要让柱子空抽，这一步需要 3~30 分钟才能让全部滤液过滤完毕。当质粒总量超过 0.8mg 时，抽滤时间会超过 30 分钟或更长时间，此时，取下柱子装入 50ml 收集管中按离心方案进行过柱，以确保全部滤液都过滤完毕，余下清洗步骤也用离心操作。

11. 加入 2.0 ml Buffer ETR 至柱子，打开真空泵进行抽滤，过滤完毕后关闭真空泵。
12. 加入 6 ml Buffer PW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，过滤完毕后关闭真空泵。
13. 取下延长管并弃去，再加入 0.9ml Buffer PW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，过滤完毕后关闭真空泵。
14. 取下柱子装到收集管，13,000 × g 离心 3 分钟，按第 15 步进行洗脱。

转染级质粒 DNA 的洗脱 (1EU// μ g)

15. 把柱子套在 2ml 离心管中，加入 100~250 μ l Buffer TE 或灭菌水至柱子中，静置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟，把质粒 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 或待用。

这一步得到的质粒 DNA 可以直接用于细胞转染，但不建议用于动物注射或敏感细胞转染。低拷贝载体或富含 RNA 菌种，质粒 DNA 可能会含有 RNA 污染，会造成 OD260 吸光值很高，质粒浓度与电泳亮度不符合，此时建议电泳校准核酸浓度后使用或按注射级方案进行处理。

注射级质粒 DNA 的洗脱 (<0.1EU/ μ g)

15. 加入 700 μ l 灭菌水至柱子中，静置 1 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。
16. 转移全部滤液至 2.0ml 离心管中，加入 100 μ l Buffer ER2 和 200 μ l Buffer E3 滤液中，颠倒 6-8 次，冰上或 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 10 分钟，其间颠倒数次。室温下，13,000 × g 离心 10 分钟。

低温下，Buffer ER2 溶于水并与内毒素分子结合。超过 15 $^{\circ}$ C 时，Buffer ER2 和内毒素会形成液滴状且不溶，离心后在管底形成红色液层。若实验室温度低于 15 $^{\circ}$ C 时，冰浴后，50 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟后再离心。若离心后没有分层，50 $^{\circ}$ C 度温育 5 分钟，重复离心步骤并确保离心机恢复至室温。

17. 转移上清液至新的离心管中，加入 0.8 倍体积异丙醇至上清液中，颠倒混匀 15 次，13,000 × g 离心 15min。

受离心机角度影响，部分 DNA 沉淀可能粘附的管壁上。若 DNA 沉淀粘附不紧，离心后取出离心管后再颠倒数次让沉淀从管壁上脱落，再重复离心步骤。

18. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 × g 离心 3min。
19. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5min。
20. 加入适量灭菌水至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。