

## MaxPure Plasmid EF Giga Kit

### 质粒宏量提取试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 1L 细菌培养液中提取高浓度和高产量的低内毒素质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 10mg，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 2μg/μl，可直接用于细胞转染和动物注射等。70 分钟可以完成整个抽提工作，操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀。[本产品只适合处理高拷贝数载体，每 ml 菌液质粒含量必须大于 2ug。]

### 产品组份

Cat.No.	P1009-01	P1009-02	P1009-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	50 mg	5 x 50 mg
Buffer E1	120 ml	550 ml	5 x 550 ml
Buffer E2	90 ml	450 ml	5 x 450 ml
Buffer E3	120 ml	550 ml	5 x 550 ml
Buffer E4	90 ml	450 ml	450 ml
Buffer E5	90 ml	450 ml	450 ml
Buffer PEW2	10 ml	25 ml	100 ml
Buffer TE	15 ml	60 ml	250 ml
MaxPure Giga Column	2	10	10
Clear Maxi Syringe	2	10	10
黄色大柱（空）	2	10	10
50ml Centrifuge Tubes C	2	10	10

版本号：202401

## 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。

## 准备条件

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PEW2 瓶子中于室温保存。
- 加入 0.2~0.5ml 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。
- LB 培养液和相应的培养瓶

## 实验步骤

1. **将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含 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，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 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，用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。
2. **在 5L 培养瓶中加入 1000ml 含抗生素 LB 培养液，移液器 1.0 ml 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，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。纯化大柱最大结合力为 1000 $\mu$ g，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。2 $\times$ 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，按细菌生物量进行转换。
3. **4,000~5,000  $\times$  g 离心 15 分钟收集 1000ml 菌液。**倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。  
若有大型高速离心机时，8000rpm 离心 3 分钟收集细菌。
4. **加入 40ml Buffer E1/RNase A 至菌体中，高速涡旋重悬细菌。**  
充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显的菌块。

5. 加入 40ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 10~15 次。室温放置 5 分钟，其间颠倒混匀数次直至完全裂解。

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 40ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~30 次或直至形成蛋花状悬浊液。4,000~5,000 × g 离心 15 分钟。

加入 Buffer E3 后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量较多时，中和时会形成大块且紧密沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让大块沉块团分散成较少的团块，让 Buffer E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。若有大型高速离心机时，8000rpm 离心 10 分钟。

7. 取出 Clear Maxi Syringe 的活塞，转移 60ml 上清液(第 6 步)至针筒中，缓慢插入活塞并推动活塞把溶液过滤到合适容器中。缓慢拔出活塞，再把余下上清液转移至针筒中，缓慢插入活塞并推动活塞把溶液过滤到合适的容器中。

若拔出活塞时，内环或滤膜有轻动时，再推入活塞压紧内环和滤膜，然后慢慢地缓慢地拔出活塞，不要让滤膜和内环松动。

8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液，颠倒 10~15 次，室温放置 5 分钟。

9. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把 MaxPure Giga Column 插到真空抽滤盒的接口处。

10. 倒入 60ml 混合液(第 8 步)柱子中，打开真空泵进行抽滤，继续倒入混合液至柱子中抽滤，直到所有的混合液都从柱子过滤完毕。

当柱子中余下 3-10ml 液体时，要立即加入余下的混合液，不要让滤膜抽干，当滤膜空抽时，空气经过柱子会产生大量的气泡会造成过滤速度变慢。

11. 当溶液过滤完毕后，立即关闭真空泵，让压力下降为零。加入 40ml Buffer E5 至柱子，打开真空泵进行抽滤，直至溶液全部过滤完毕后。

12. 关闭真空泵，让压力下降为零。加入 40ml Buffer PEW2，静置 3 分钟，打开真空泵进行抽滤，直至溶液全部过滤完毕后。

13. 加入 20ml 无水乙醇至柱子，继续抽滤直到溶液全部过滤完毕，不要关闭真空泵，再抽滤 15 分钟干燥柱子。

14. 取下柱子，60℃烘箱中放置 15 分钟干燥柱子的滤膜，然后按直接洗脱或间接洗脱进行操作。

#### 直接洗脱：

15. 加入 4.0ml Buffer TE 至柱子的膜中央，缓慢插入活塞并慢慢推动活塞，让洗脱液挤到 50ml Centrifuge Tubes C 中。最后快速拔出活塞，让注射器的内环和滤膜松动，让滤膜和内环随活塞一起上升到柱子的中上部。

用活塞推动时，约为 2~2.5ml 洗脱液残留在膜上无法得到挤出，按第 16 步操作离心甩出洗脱液以提高产量。

16. 用干净的镊子取出内环弃去，再用镊子取出滤膜放到黄色大柱中，最后把黄色大柱装在 50ml Centrifuge Tubes C 中。8000rpm 离心 5 分钟甩出滤膜的全部洗脱液。

17. 转移质粒溶液至 2.0ml 离心管中，把质粒保存于-20℃。

#### 间接洗脱（低拷贝载体或富含 RNA 的菌种）：

15. 加入 10ml 灭菌水和 5ml Buffer E1/RNase A 至柱子的膜中央，缓慢插入活塞并慢慢推动活塞，挤出洗脱液至 50ml Centrifuge Tubes C 中。

用活塞推动时，约为 2ml 洗脱液残留在膜上无法得到挤出。由于加入足够的洗脱液，损失的 2ml 洗脱液只占了少量的 DNA。

16. 弃去柱子，加入 1.5ml Buffer E3 至滤液，混匀。

17. 加入 0.8 倍异丙醇至滤液中，颠倒混匀 15~30 次，室温放置 5 分钟。4℃，8,000rpm 离心 20min。

离心后，DNA 沉淀物有可能看不到，特别是处理中低拷贝数载体时，DNA 产量太少形成的沉淀更不可见。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. 倒弃上清液，加入 5ml 75%乙醇，涡旋 5 秒，颠倒 10 次，4℃，8,000rpm 离心 5min。

19. 小心倒弃上清液，短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 10min。

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，转移 1.5ml 离心管中，保存于-20℃。