

## MaxPure Plasmid EF Mini to Maxi Kit B

### 无内质粒小柱大提试剂盒 B

本产品适合于从 100~200ml 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	P1233-01	P1233-02	P1233-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	20 mg	90 mg
Buffer E1	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer E2	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer E3	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer E4	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer ETR	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer EWB	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer PW2*	2 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE	3 ml	15 ml	30 ml
中量过滤器 30ml	2	10	50
纯化大柱 FE5	2	10	50
5ml 圆底离心管	2	10	50
50ml 收集管 (带垫片)	2	10	50

版本号：202505

### 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。
- 若采用水平或桶状离心机时，把离心速度调至最高速度(~5000rpm)，由于水平转子离心力一般较低，第 17 步洗脱时死体积较大(~50  $\mu$ l)，建议每次加入不少于 150 $\mu$ l 洗脱液以充分洗脱出 DNA。使用角度离心机时，第 16-17 步洗脱时提高离心速度至 10000rpm，可以有效减少死体积至~10 $\mu$ l。为获得更高浓度核酸，每次洗脱可以低至 60 $\mu$ l。

## 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 500-1000ml 培养瓶加入 100~200ml 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 14-16 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 x 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 80ml。
3. **8,000rpm 离心 3 分钟收集◆100ml (高拷贝) 或●150~200ml 菌液 (中低拷贝)，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**  
超高拷贝载体 (1ml 菌液含 8-15 $\mu$ g 质粒) 时，菌液用量为 100ml。进行抽滤操作时，建议菌液用量不超过 100ml，以减少堵柱的风险。水平或桶装离心管：5,000rpm 离心 10 分钟收集细菌。
4. **加入◆5ml 或●8ml 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 或●8ml 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 4 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。当菌液用量达 200ml 时，裂解液会极为粘稠，属于高密度碱裂解类型，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并轻稍振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过 5 分钟。

- 加入◆5ml或●8ml 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, 8,000 rpm 离心 3 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 200ml 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, 并稍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。  
水平或桶装离心管: 5,000rpm 离心 10 分钟。

- 取出过滤器活塞, 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。
- 测量滤液体积, 加入 1/3 倍体积 Buffer E4, 颠倒混匀 10~15 次, 按离心操作或抽滤操作。

### 离心操作

- 把纯化大柱 FE5 装到收集管中, 转移不超过 10ml 混合液至柱子中, 盖紧盖子, 8,000rpm 离心 1 分钟, 倒弃废液把柱子套回离心管, 转移余下的混合液至柱子中并离心。  
第 9-12 步, 使用水平或桶状离心机时, 5000rpm 离心 2 分钟。

- 倒弃废液, 把柱子套回收集管中, 加入 2.5ml Buffer ETR, 8,000rpm 离心 1 分钟。

- 倒弃废液, 把柱子套回收集管中, 加入 2.5ml Buffer EWB, 8,000rpm 离心 1 分钟。

- 倒弃废液, 把柱子套回收集管中, 加入 4.5ml Buffer PW2, 8,000rpm 离心 1 分钟。

- 倒弃废液, 把柱子套回收集管中, 8,000 rpm 离心 10 分钟。

采用水平桶状离心机, 这一步建议最高速度 (5000rpm) 离心 15 分钟甩干柱子。

- 取出柱子, 室温放置 10 分钟干燥柱子。

- 倒弃收集管滤液, 反扣于吸水纸上拍打吸尽残液, 放入一个新的 5ml 圆离心管。

- 加入 100~250 $\mu$ l Buffer TE 至柱子中, 放回收集管并让纯化大柱底部插入离心管中, 盖紧盖子, 静置 2 分钟, 8000rpm 离心 2 分钟。

- 加入 100~250  $\mu$ l Buffer TE 至柱子, 静置 2 分钟, 8000rpm 离心 2 分钟, 弃去柱子, 取出 5ml 离心管, 盖好盖子, 待用或保存于 -20 度。

采用水平桶状离心机 (5000rpm), 柱子~40 $\mu$ l 洗脱液残留, 建议两次洗脱不少于 150 $\mu$ l。角度离心机 8000rpm 离心, 柱子有~20 $\mu$ l 洗脱液残留。质粒总量超过 1.5mg 时, 洗脱时柱子因滤膜内质粒浓度高造成堵柱, 洗脱液无法离心甩出。堵塞产生时用移液枪头刺破滤膜后再离心, 3 次洗脱 (每次加入 200 $\mu$ l 洗脱液), 13000  $\times$  g 离心 5 分钟去除脱落的滤膜, 把上清液转移至 1.5ml 离心管中。

**抽滤操作：**建议不超过 100ml 菌液，抽滤力量较少，过量菌液会造成柱子堵塞。

9. 把纯化大柱 FE5 插到真空抽滤盒接口处。
10. 把混合液（第 8 步，一次不要超过 19ml）转移或倒入柱子中，打开真空泵进行抽滤，继续加入混合液至柱子进行抽滤（及时加入混合液，不要让柱子空抽），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，空抽时会产生大量气泡引起过滤速度变慢，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 2.5ml 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 2.5ml Buffer EWB 至柱子，打开真空泵进行抽滤，过滤完毕后关闭真空泵。
13. 加入 4.5ml 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. 按离心方案的第 14~17 步洗脱出 DNA。

## 质粒的重沉淀除 RNA

中低拷贝载体如慢病毒/线病毒载体，>8KB 载体，或质粒含量低于 3ug/ml LB 培养过夜菌液，易有 RNA 污染造成 OD 浓度虚高，部分载体会虚高 1~3 倍。由于污染 RNA 片段很短，电泳时多数不可见（无明显条带），但能发现电泳后 DNA 条带亮度与 OD 浓度不相符。用异丙醇沉淀纯化，OD 浓度会显著下降回归正常，这是因为短片段 RNA 不能有效沉淀而去除，特别是低拷贝载体更为明显。异丙醇能高效沉淀质粒 DNA，回收率超过 85%，并不会引起质粒 DNA 明显产量下降。

1. 取质粒 DNA 至 2.0 ml 离心管中，加入灭菌水至 800ul，加入 200ul Buffer E3 至总体积为 1ml，颠倒混匀。
2. 加入 700ul 异丙醇，颠倒混匀 10-15 次，室温静置 3min，13,000rpm 离心 10min。  
离心后，DNA 沉淀有可能看不到，特别是中低拷贝数载体，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。若 DNA 沉淀粘附不紧，取出离心管再颠倒数次让沉淀从管壁上脱落，再重复离心，离心可以在常温进行也可以在 2-8°C 进行。
3. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 rpm 离心 3min。
4. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5min。
5. 加入适量 Buffer TE，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒 DNA 充分溶解。