

MaxPure Low Copy Plasmid EF Kit

低拷贝质粒小柱中提试剂盒（转染级）

本产品适合于从 25~100ml 细菌培养液中提取高浓度的转染级质粒 DNA。试剂盒采用独特的溶液体系和硅胶膜抽提体系，是专门为中低拷贝数载体和超低拷贝数载体而设计的，质粒最高产量可达 100ug，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 1μg/μl，得到的质粒可直接用于细胞转染和其它应用。

产品组分

产品编号	P1230-01	P1230-02	P1230-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	50 ul	5 mg	20 mg
Buffer CL	0.5 ml	3 ml	12 ml
Buffer P1	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer P2	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer LEN3	5 ml	25 ml	110 ml
Buffer LN4	20 ml	100 ml	2 x 250 ml
Buffer EWB	5 ml	25 ml	110 ml
Buffer PW2*	6 ml	10 ml	50 ml
Buffer TE	1.8 ml	10 ml	30 ml
Clear Mini Syringe	2	10	50
纯化大柱 FC8	2	10	50
5ml 圆底离心管	2	10	50
50ml 收集管(带垫片)	2	10	50

保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 室温运输和保存，长期保存(>3 个月)放置于-20~-8℃。低温下，Buffer P2/LN4 会有沉淀形成，55℃水浴使沉淀完全溶解后使用。

准备事项

- 加入 0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀溶解 RNase A，然后全部转移至 Buffer P1 中，若 RNase A 是液体的，短暂离心后转移至 Buffer P1 中，2-8℃ 保存有效期为 6 个月。
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PV2，于室温保存。
- 低温下，Buffer P2/LN4 有沉淀析出，于 55℃ 水浴溶解。
- 本产品最高吸附力只能达到 100µg，处理高拷贝数载体菌液不超过 25ml，中低拷贝载体不要超过 50ml，超低拷贝载体最高用到 90ml。
- 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比较低，洗脱时死体积较大(~50µl)，建议每次加入不少于 150µl 洗脱液以充分洗脱出 DNA。使用角度离心机时，洗脱时提高离心速度至 10000rpm，可以有效减少死体积至~20µl，此时为获得更高浓度核酸，每次洗脱可以低至 80µl。

实验步骤

1. **激活柱子：**把纯化大柱 FC8 装在 50ml 收集管中，加入 0.2ml Buffer CL 至柱子滤膜中，静置 5-15 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟，备用。
2. **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。
3. **在◆250ml 培养瓶加入 50ml(中低拷贝质粒) LB/抗生素培养液；或在■500ml 培养瓶中加入 100ml(超低拷贝质粒) LB/抗生素培养液，接种 0.1% 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 12-16 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 × 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。纯化柱最大结合力为 100µg, 用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量和洗脱液。

4. 8,000rpm 离心 3 分钟, 收集◆50ml 或■100ml 菌液, 倒弃培养基, 在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

或 5,000rpm 离心 10 分钟收集细菌。

5. 加入 4 ml Buffer P1/RNase A 混合液, 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。若涡旋未能充分打散菌块, 用移液器吸打数次。

6. 加入 4 ml Buffer P2 至重悬液, 温和地上下颠倒并转动离心管 10~15 次, 室温静置 5 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 75ml 时, 裂解液会极为黏稠, 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, 并轻微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。

7. 加入 2 ml Buffer LEN3 至裂解液, 上下颠倒混匀 15~20 次或直至形成蛋花状悬液, 8,000 rpm 离心 3 分钟。

加入 Buffer LEN3 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 75ml 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, 并轻微振荡让大块沉淀团分散成较少的团块, 让 Buffer LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。5,000rpm 离心 10 分钟收集细菌。

8. 取出过滤器活塞, 把上清液倒入针筒, 推动活塞使中和液过滤到 50ml 离心管(自配)中。

9. 加入等倍体积的 Buffer LN4 至滤液中, 颠倒混匀 6-8 次。

10. 转移一半体积的混合液至纯化大柱 FC8 (已激活), 8,000 rpm 离心 1 分钟, 倒弃滤液把柱子装回收集管中, 把余下的混合液再转移至柱子中并离心。

第 9-11 使用水平或桶状离心机时, 5000rpm 离心 2 分钟。

11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中, 加入 2.0 ml Buffer EWB, 8,000 rpm 离心 1 分钟。

12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中, 加入 4.5 ml Buffer PW2, 8,000 rpm 离心 1 分钟。

13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中, 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。

14. 取出柱子，室温放置 10~15 分钟进一步晾干柱子。
15. 倒弃收集管的滤液，反扣于吸水纸上拍打吸尽残液，放入一个新的 5ml 圆底离心管至 50ml 收集管中。
16. 加入 100~150 μ l Buffer TE 至纯化大柱 FC8 的膜中央，把柱子放回收集管中，并让柱子底部插入 5ml 离心管中，盖紧盖子，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。
17. 再加入 100~150 μ l Buffer TE 至纯化大柱 FC8 的膜中央，盖紧盖子，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。弃去柱子，小心取出离心管，得到 DNA 待用或保存于-20 度。

采用水平或桶状离心机 5000rpm，柱子~50 μ l 洗脱液残留，建议两次洗脱，每次为 150ul。

角度离心机 8000rpm 离心，柱子有 20 μ l 洗脱液残留，建议两次洗脱，每次为 100ul。

常见问题

- **质粒拷贝数:** 载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2~3 倍的产量波动，(每毫升培养过夜的菌液，高拷贝数的质粒载体产量为 4~16 μ g)。长片段质粒 (>8KB)和表达型载体常以中低拷贝数为主，每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μ g。
- **菌种问题:** 菌种保存过程中存在质粒丢失现象，养菌前最好先划线活化，以稳定产量。
- **细胞未充分裂解:** 细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **低温离心:** 加入 Buffer LN4 后，不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** Buffer LN4 不能低温放置，Buffer E2/LN4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer LN4 体积:** Buffer LN4 加入量是上清体积的等倍。过多或不足的 Buffer LN4 会导致产量的波动。