

MaxPure Plasmid EF HC Kit

无内小柱中提试剂盒（高拷贝）

本产品适合于从 50~75ml 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 1mg，内毒素含量 <0.1EU/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。

产品组分

产品编号	P1231-01	P1231-02	P1231-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	50 μl	10 mg	30 mg
Buffer E1	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer E2	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer E3	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer E4	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer ETR	5 ml	20 ml	90 ml
Buffer PW2*	6 ml	6 ml	20 ml
Elution Buffer (Endo Free)	1.8 ml	10 ml	30 ml
Buffer ER2	1.5 ml	1.5 ml	6 ml
Clear Mini Syringe	2	10	50
MaxPure EF Mini Column	2	10	50
50ml Centrifuge Tubes	2	10	50
Extender Tube	2	10	50
Support Tube	2	10	50
2ml Collection Tube	2	10	50

版本：202601

P1231-03 装箱备注：A 盒：试剂+酶+柱子收集管+延长管+支撑柱+10ml 针筒

B 盒：50ml 离心管

保存条件

本产品在室温下保存 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 0.5ml 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。

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 250~500ml 培养瓶加入 50~75ml 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 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 × 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 20~30ml。

3. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集 50~75ml 菌液，倒弃培养基，吸水纸上拍打吸尽残液。
4. 加入 3 ml Buffer E1/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。

5. 加入 3 ml 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。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。

6. 加入 3 ml 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 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 E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 取出过滤器活塞，把上清液倒入针筒，推动活塞将液体过滤到 15~50ml 离心管中。
8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4(~2.8ml)，颠倒混匀 10-15 次。
9. 把 Extender Tube 插到 MaxPure EF Mini Column 中，并装在 Support Tube 中，最后再一起放到 50ml Centrifuge Tubes 中。

为防止柱子从 Extender Tubes 和 CFDNA 柱子的侧壁流出，把 Extender Tubes 用力插到柱子中，不要使用其他 50ml 离心管。当 Extender Tube, CFDNA Column 和 Support Tubes 放到 50ml 离心管中后，有 2-3mm 突出，在操作第 10 步时，盖上盖子，用力下压并旋紧盖子。

抽滤操作：第 10-15 步可以用负压抽滤进行操作：把 MaxPure EF Mini Column 插到负压装置中，然后把 Extender Tube 装到柱子中，然后依次加入样品进行抽滤，加入 1.5ml Buffer ETR 至柱子抽滤，加入 1.5ml PW2 至柱子抽滤，滤完后取下 Extender Tube 并弃去，再加入 0.8ml 无水乙醇至柱子抽滤，滤完后再抽滤 10 分钟干燥柱子，按第 16 步进行洗脱。

10. 把第 8 步获得的混合液全部转入 MaxPure EF Mini Column Set 中，盖上盖子，2,000 rpm 离心 5 分钟。
11. 取下柱子并装在 2ml 收集管，加入 0.7ml Buffer ETR 柱子中，13,000 x g 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液并柱子装回收集管，加入 0.7ml Buffer ETR 柱子中，13,000 x g 离心 1 分钟。
13. 倒弃滤液把柱子套在收集管，加入 0.7ml Buffer PW2 至柱子中，13,000 x g 离心 1 分钟。

14. 倒弃滤液把柱子套在收集管，加入 0.7ml Buffer PW2 至柱子中，13,000 x g 离心 1 分钟。
15. 倒弃滤液把柱子套在收集管，13,000 x g 离心 2 分钟。
16. 把柱子套在 1.5ml 离心管，加入 150~300 μ l Elution Buffer (Endo Free) 至柱子膜中央，静置 2 分钟。13,000 x g 离心 1 分钟。
17. 把洗脱液再转移至柱子中，静置 2 分钟，13,000 x g 离心 1 分钟，弃去柱子把质粒保存于-20 $^{\circ}$ C。
 - 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 可能会含有短片段 RNA，会造成 OD260 吸光值很高，质粒 OD 浓度与电泳亮度不符合。建议电泳后校准核酸浓度后再使用或无内毒素质粒方案可以去除短片段 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。

附加流程：无内毒素质粒 DNA 制备 (0.1EU/ μ g)

1. 转移质粒 DNA 至 1.5ml 离心管中，加入适量的 Elution Buffer 至总体积为 500 μ l，加入 60 μ l Buffer E1/RNase，60 μ l Buffer E3，以及 60 μ l Buffer ER2，颠倒 6-8 次。
2. 冰上（或 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱）放置 10~15 分钟，其间颠倒数次，45~55 $^{\circ}$ C 温育 5 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 和内毒素会形成囊泡小体且不溶。
3. 室温 13,000 x g 离心 15 分钟，转移上清液至新的离心管中。
4. 加入 0.7 倍体积异丙醇，涡旋混匀 10 秒，静置 10 分钟，13,000 x g 离心 15 分钟。
5. 小心倒弃上清液，加入 1.0 ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 x g 离心 5 分钟。
6. 小心倒弃上清液，短暂离心吸尽所有残液，空气干燥 5~10 分钟。
7. 加入 Elution Buffer (Endo-Free)至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10 分钟让质粒充分溶解。