

## 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 | P1232-02B | P1232-03B |
|----------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| 包装次数                       | 2 次      | 10 次     | 50 次     | 10 次      | 50 次      |
| RNase A                    | 100 μl   | 10 mg    | 30 mg    | 10 mg     | 30 mg     |
| Buffer E1                  | 11 ml    | 60 ml    | 270 ml   | 60 ml     | 270 ml    |
| Buffer E2                  | 11 ml    | 60 ml    | 270 ml   | 60 ml     | 270 ml    |
| Buffer E3                  | 11 ml    | 60 ml    | 270 ml   | 60 ml     | 270 ml    |
| Buffer E4                  | 11 ml    | 60 ml    | 270 ml   | 60 ml     | 270 ml    |
| Buffer E5                  | 4 ml     | 20 ml    | 90 ml    | 20 ml     | 90 ml     |
| Buffer PW2*                | 6 ml     | 6 ml     | 20 ml    | 6 ml      | 20 ml     |
| Elution Buffer (Endo-Free) | 10 ml    | 10 ml    | 30 ml    | 10 ml     | 30 ml     |
| Buffer ER2                 | 1.8 ml   | 1.8 ml   | 6 ml     | 1.8 ml    | 6 ml      |
| Clear Midi Syringe         | 2        | 10       | 50       | 10        | 50        |
| MaxPure EF Min Column C    | 2        | 10       | 50       | 10        | 50        |
| 2 ml Collection Tubes      | 2        | 10       | 50       | 10        | 50        |
| Extender Tube              | 2        | 10       | 50       | 10        | 50        |
| 50ml Centrifuge Tubes      | 2        | 10       | 50       | /         | /         |
| Support Tube               | 2        | 10       | 50       | /         | /         |

P1232 为离心和抽滤型，P1232B 为纯抽滤型，版本号：202601

P1232-03 装箱备注：A 盒：试剂+酶+针筒+延长管

B 盒：50ml 离心管+收集管+柱子+支撑柱

## 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 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（转染级）

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中可能会丢失载体，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 0.1%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 30ml。

3. 4,000~5,000 rpm 离心 10 分钟收集 50~100 ml 菌液，倒弃培养基，吸水纸拍打吸尽残液。

4. 加入 5ml 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，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。

- 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，并轻微振荡让大块沉淀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。

- 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。
- 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4，颠倒混匀 10-15 次，按抽滤或离心操作。

### 离心操作

- 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，不要使用其他 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。

- 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。
- 倒弃废液把柱子套回离心管中，把剩余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。弃去延长管，支撑管和 50ml 离心管和废液。
- 把 MaxPure EF Column C 套在收集管，加入 0.75ml Buffer E5，13,000 × g 离心 1 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 0.75ml Buffer E5，13,000 × g 离心 1 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 0.75ml Buffer PW2，13,000 × g 离心 1 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 0.75ml Buffer PW2，13,000 × g 离心 1 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管中，13,000 × g 离心 3 分钟。
- 把柱子套在 2ml 离心管中，加入 150~200 μl Elution Buffer (Endo Free)至柱子中，静置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。
- 加入 150~200 μl Elution Buffer (Endo Free)至柱子中，静置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把质粒 DNA 保存于-20°C 或待用。

### 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。  
当质粒总量超过 0.8mg 时, 抽滤时间会超过 20 分钟或可能会堵柱, 产生堵柱时, 把未抽滤完的液体转移至离心管中, 然后按离心方案进行操作。
11. 加入 1.5ml Buffer ETR 至柱子进行抽滤, 滤完后加入 1.5ml Buffer PW2 至柱子中进行抽滤。
12. 滤完后取下延长管并弃去, 加入 0.9ml 无水乙醇至柱子, 滤完后再次抽滤 10 分钟干燥柱子。
13. 把柱子套在 2ml 离心管中, 加入 100~200 $\mu$ l Elution Buffer (Endo Free)至柱子中, 静置 3 分钟, 13,000  $\times$ g 离心 1 分钟。
14. 加入 100~200 $\mu$ l Elution Buffer (Endo Free)至柱子中, 静置 3 分钟, 13,000  $\times$ g 离心 1 分钟。弃去柱子, 把质粒 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C 或待用。

### 附加流程: 无内毒素质粒 DNA 制备 (0.1EU/ $\mu$ g)

1. 转移质粒 DNA 至 1.5ml 离心管中, 加入 Elution Buffer 至总体积为 800  $\mu$ l, 加入 100 $\mu$ l Buffer E1/RNase A, 100 $\mu$ l Buffer E3 以及 100 $\mu$ 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 溶于水并与内毒素结合, 超过 15 $^{\circ}$ C, Buffer ER2 和内毒素形成囊泡小体且不溶。
3. 室温下, 13,000  $\times$ 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  $\times$ g 离心 15 分钟。
5. 小心倒弃上清液, 加入 1.0ml 的 75%乙醇, 涡旋 5 秒, 13,000  $\times$ g 离心 3 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。