

## MaxPure Plasmid EF Giga Kit

### 去内毒素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。

### 产品组份

Cat.No.	P1224-01	P1224-02	P1224-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	20 mg	60 mg	5 × 60 mg
Buffer E1	110 ml	550 ml	5 × 550 ml
Buffer E2	110 ml	550 ml	5 × 550 ml
Buffer E3	110 ml	550 ml	5 × 550 ml
Buffer EP4	100 ml	500 ml	5 × 500 ml
Buffer E5	100 ml	500 ml	5 × 500 ml
Buffer PEW2	20 ml	100 ml	2 × 100 ml
Buffer ER2	5 ml	20 ml	100 ml
活塞	2	10	10
MaxPure DNA Giga Column	2	10	10
Clear Maxi Syringe	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/EP4 会有沉淀形成，55℃水浴使沉淀完全溶解。

## 准备条件

- 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。
- 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。
- 50ml 离心管。
- LB 培养液和相应的培养瓶

## 实验步骤

1. 将含质粒的菌种接种于含有 1 ml LB/抗生素培养液的培养管中，37℃摇床培养 8 小时小量扩增菌种。在 5L 培养瓶中加入 1L 含抗生素 LB 培养液，接种 1/1000 初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养 12~16 小时。

不要用 TB 或 YT 等丰富培养基进行培养细菌。使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。本产品不推荐处理低拷贝数的载体。建议处理每 ml 菌液(LB 培养液)可以得到 >3ug 质粒 DNA 的菌株。

2. 4,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 1L 菌液。
3. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。加入 45ml Buffer E1/RNase A 至菌体中，高速涡旋重悬细菌。
4. 加入 45ml 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

3~5 次。

5. 加入 45ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~30 次或直至样品充分混匀。4,000~5,000 x g 离心 20 分钟。
6. 取一个新的 Clear Maxi Syringe，小心取出过滤器的活塞。转移一半体积的上清液(第 5 步)至针筒中。插入活塞把溶液过滤到合适的容器中。过滤完毕后，缓慢取出过滤器的活塞。把剩余的上清液转移至针筒中，再插入活塞把溶液过滤到容器中。  
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，然后慢慢地缓缓地拔出活塞，不要让滤膜和内环松动。
7. 测量滤液体积，加入 1/3 体积 Buffer EP4 至滤液中，颠倒 10~15 次。室温静置 10 分钟。
8. 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；
9. 倒入 60ml 混合液(第 7 步)至柱子中，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，关闭真空泵。  
抽滤时，不要等到溶液抽干后再加入液体，要不间断地加入液体，以防上滤膜干抽时产生大量的泡沫，造成液体过滤速度变慢。
10. 加入 45ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，抽滤完毕后，关闭真空泵。
11. 加入 30ml Buffer PEW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，加入 30ml 无水乙醇至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当溶液抽滤完毕后，不要关闭真空泵再抽滤 15 分钟干燥柱子。
12. 取下 MaxPure Giga Column 放入合适架子上，加入 12ml 灭菌水和 3ml Buffer E1/RNase A 至柱子中，振荡混匀，静置 3 分钟，缓慢插入活塞并慢慢推动活塞，把液体挤至普通的 50ml 离心管（自备），约可以得到 13ml 的滤液，弃去柱子。
13. 加入 3ml Buffer E3 至滤液中，颠倒混匀 6-8 次。

14. 加入 0.1 倍体积的 Buffer ER2 (~1.5ml) 至滤液中, 颠倒混匀 6~8 次, 冰上放置 10 分钟, 其间颠倒混匀数次。42-50°C 温育 5 分钟, 室温下, 4,000~5,000rpm 离心 10 分钟。低温下, Buffer ER2 溶于水, 并与内毒素结合在一起。超过 20°C 时, Buffer ER2 和内毒素会形成液滴状且不溶于水, 离心后会在管底分层形成红色溶液层, 转移上清液不要吸到下层红色液层。若离心后没有分层, 42~50°C 度温育 3 分钟, 重复离心步骤并确保离心机恢复至室温。若离心后上清液中有少量的油滴状液滴悬浮, 静置 5-10 分钟让液滴沉淀至管底。也可以重复离心步骤, 并调整离心机的降速参数为缓慢降速, 取出离心管时要小心缓慢以防止搅动液体。若质粒用于动物注射或高敏应用, 建议重复第 14 步两次以达到超低内毒素级 (<0.1EU/ug)。
15. 小心转移上清液至 50ml 高速离心管 (50ml Centrifuge Tubes C) 中, 加入 0.8 倍体积的异丙醇, 颠倒混匀 15~20 次, 室温放置 10 分钟。4°C, 8,000rpm 离心 20min 沉淀质粒 DNA。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。
16. 倒弃上清液, 加入 10ml 75%乙醇, 涡旋 5 秒, 颠倒混匀 10 次。4°C, 8,000rpm 离心 5min。
17. 小心倒弃上清液, 短暂离心, 吸尽所有残液, 空气干燥 10min。
18. 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°C。