

## MaxPure Plasmid EF Giga Kit

低内质粒宏量试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 1.0~1.5L 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 20 mg，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 分

| Cat.No.                    | P1117-01 | P1117-02 | P1117-03   |
|----------------------------|----------|----------|------------|
| 包装次数                       | 2 次      | 10 次     | 50 次       |
| RNase A                    | 10 mg    | 50 mg    | 5 x 50 mg  |
| Buffer E1                  | 90 ml    | 450 ml   | 5 x 450 ml |
| Buffer E2                  | 90 ml    | 450 ml   | 5 x 450 ml |
| Buffer E3                  | 90 ml    | 450 ml   | 5 x 450 ml |
| Buffer E4                  | 90 ml    | 450 ml   | 5 x 450 ml |
| Buffer ETR                 | 90 ml    | 450 ml   | 4 x 450 ml |
| Buffer PEW2                | 20 ml    | 100 ml   | 5 x 100 ml |
| Elution Buffer (Endo-Free) | 30 ml    | 200 ml   | 2 x 400 ml |
| Buffer ERS1                | 10 ml    | 40 ml    | 180 ml     |
| Buffer ERS2                | 10 ml    | 40 ml    | 180 ml     |
| MaxPure Giga Column        | 2        | 10       | 50         |
| Clear Mega Syringe         | 2        | 10       | 50         |
| Concentrate Maxi Column    | 2        | 10       | 50         |
| 50ml Centrifuge Tubes C    | 2        | 10       | 50         |

版本号：202601

## 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。

## 准备条件

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PEV2 瓶子中于室温保存。
- 加入 0.2~0.5ml 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。
- 500~1000ml 带橡胶塞的抽滤瓶。

## 实验步骤

1. 将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含 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，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 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，用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。

2. 在 5L 培养瓶中加入 1000~1500ml 含抗生素 LB 培养液，移液器 1ml 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，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD<sub>600</sub> 应该在 2.0-3.0。纯化大柱最大结合力为 1000μg，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。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，按细菌生物量进行转换。

3. 4,000~5,000×g 离心 20 分钟收集 1000~1500ml 菌液。倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。

4. 加入 40 ml Buffer E1/RNase A 至菌体中，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。

5. 加入 40 ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 10~15 次。室温放置 5 分钟，其间颠倒混匀数次直至形成透亮均匀的裂解液。

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。
6. 加入 40 ml Buffer E3 至裂解液中，立即颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液。

4,000~5,000 × g 离心 15 分钟。

加入 Buffer E3 后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量较多时，中和时会形成大块且紧密沉淀团，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，转移一半上清液[第 6 步]至针筒中，插入活塞并缓慢挤出液体到容器，再缓慢取出活塞，把余下上清液倒入针筒中，插入活塞并缓慢挤出液体到容器。
8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液，颠倒混匀 10~15 次。

为了监控 DNA 的得率，取 0.5ml 滤液至新的离心管，加入 150ul 异丙醇混匀，转移混合液至 DNA 小量柱离心过柱，按小提试剂盒进行清洗（PW1/PW2）和洗脱，计算出 DNA 的产量，最后按体积换算出大体积的产量。
9. 连接好真空泵和三角抽滤瓶，把鲁尔针刺接头插入橡胶塞，并检查通气效果，最后把 MaxPure Giga Column 插到接口处。
10. 倒入 60ml 混合液[第 8 步]柱子中，打开真空泵进行抽滤，及时倒入混合液（不要空抽）至柱子中抽滤，直到所有混合液都从柱子过滤完毕，关闭真空泵。

当柱子中余下 10ml 液体时，要立即加入混合液，不要让滤膜抽干，当滤膜空抽时，滤膜内部会产生大量气泡而引起柱子堵塞或过滤速度变慢。
11. 加入 40 ml Buffer ETR 进行抽滤，滤完后再抽滤 5 分钟。
12. 加入 40 ml Buffer PEW2 进行抽滤，滤完后加入 20 ml 无水乙醇进行抽滤。
13. 滤完后再抽滤 15 分钟干燥柱子，取下 MaxPure Giga Column 放入合适架子上。
14. 加入 8~15ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子膜中央，插入活塞并轻微把洗脱液挤到滤膜内部，立即停止挤压（允许挤出少量洗脱液），静置 5 分钟让滤膜内部质粒充分溶解，然后再缓慢挤出洗脱液（每秒 2~4 滴）至 15~50 ml 离心管，保存于-20 度。

8ml 可以洗脱出 70% DNA，得到的质粒 DNA 可以直接普通细胞的转染。若采用附加流程进一步纯化质粒 DNA 时，这一步建议直接加入 15ml Elution Buffer (Endo-Free)以洗脱出全部质粒。

### 附加流程：无内毒素质粒 DNA (0.1 EU/μg)

1. 取质粒 DNA，加入适量的灭菌水至总体积的 14ml。
2. 加入 1ml Buffer E1/RNase 混匀，室温静置 10~15 分钟降解残留 RNA。
3. 加入 3 ml Buffer ERS1，涡旋混匀，室温放置 10 分钟，其间颠倒混匀数次。
4. 加入 3 ml Buffer ERS2，涡旋混匀，室温下，8,000 rpm 离心 10 分钟。  
离心后若上清液仍是浑浊的，重复离心步骤并调整离心机的降速参数为最慢下降速度。
5. 转移上清液至新的离心管中，加入 0.7 倍体积异丙醇，颠倒 15~30 次，静置 10 分钟。
6. 把 Concentrate Maxi Column 装在 50 ml 离心管 C 中，转移 10~13ml 混匀液至柱子，8000rpm 离心 1 分钟。倒弃滤液把柱子套回收集管，重复这一步把混合液都转移至柱子并离心。  
纯化柱的最大容积为 13ml，需要分 3 次过柱。
7. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 5 ml Buffer PEW2，8000rpm 离心 10 分钟。
8. 取出 Concentrate Maxi Column，打开盖子，室温干燥 10 分钟，倒弃收集管的全部液体，并在吸水纸拍打几次吸尽残液，晾干备用。
9. 把柱子套在收集管 C 中，加入 1.5ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。
10. 加入 1.5 ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20℃保存。