

MaxPure Plasmid EF Mega Kit

去内毒素质粒超大量提取试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 0.5L 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 5mg，内毒素含量 $<1\text{EU}/\mu\text{g}$ ，浓度高达 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，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.	P1223-01	P1223-02	P1223-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	30 mg	2 x 60 mg
Buffer E1	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E2	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E3	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer EP4	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E5	33 ml	200 ml	2 x 400 ml
Buffer PEW2	10 ml	50 ml	2 x 100 ml
Buffer ER2	3 ml	10 ml	30 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure EF Maxi Column	2	10	50
50ml Centrifuge Tubes	2	10	50
50ml Centrifuge Tubes C	2	10	50

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。

实验步骤

- 加入 0.2~0.5ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，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。
- 灭菌的 50ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养瓶

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 h 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 2.5L 培养瓶中加入 500mL 含抗生素 LB 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，按细菌生物量进行转换。高拷贝生物量为 450，低拷贝生物量 900。若 YT/TB 培养液培养后，OD600=10，则高拷贝菌液量为 45ml，低拷贝菌液用量 90ml。纯化大柱最大结合力为 1500μg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 转移培养液至离心管中，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 500ml 菌液。

4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 20ml Buffer E1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

彻底重悬细菌对产量很关键，充分重悬后应看不到细菌团块。

5. 加入 20 ml Buffer E2 至重悬液，颠倒混匀 8~15 次。室温静置 3~5 分钟，其间颠倒混匀数次直至完全裂解。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。当菌液用量达 500ml 时，裂解液会极为粘稠，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，并稍稍振荡让菌体充分裂解，总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 加入 20ml Buffer E3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状的悬浊液。4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

加入 Buffer E3 后，应立即颠倒混匀。充分混匀后，产生的絮状沉淀最终是均一白色的。当菌液用量达 500ml 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，并稍稍振荡让大块沉块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。

7. 取出大量过滤器的活塞，把第 6 步的上清全部倒入过滤器中。把过滤器的出水口对准离心管或合适大小的瓶子（自备）。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到合适容器中。

8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer EP4 至滤液。颠倒 6~8 次。

9. 连接好真空泵和真空抽滤盒。把 HiPure EF Maxi Column 插到真空抽滤盒的接口处；

10. 倒入 20ml 混合液(第 8 步)至柱子中，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，直到所有的混合液都从柱子过滤完毕，关闭真空泵。

及时倒入混合液，不要让柱子空抽，空抽时会产生大量气泡堵塞滤膜造成抽滤速度变慢。若无抽滤系统，第 10~12 步可以用离心方法操作代替。把 MaxPure EF Maxi Column 装在 50ml 离心管中，然后加入混合液（第 8 步）至柱子中，一次不要超过 20ml 混合液，于 3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。倒弃滤液把柱子装回收集管中，继续加入混合液（第 8 步）至柱子并离心，最后柱子经清洗液 E5、PEW2、无水乙醇清洗后，取出柱子转移至 60°C 烘箱中干燥 10 分钟。

11. 加入 10ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体完全过滤后，再抽滤 2 分钟，关闭真空泵，让压力下降至零。

12. 加入 10ml PEW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体完全过滤后，加入 10ml 无水乙醇至柱子中，当液体完全过滤后，再抽滤 15 分钟，关闭真空泵。取出柱子，于 55~65°C 烘箱干燥 10 分钟。

13. 把 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，加入 4ml 灭菌水和 2ml Buffer E1/RNase 至柱子膜中央，轻轻振荡混匀，静置 2 分钟，4,000~5,000 rpm 离心 3 分钟洗脱 DNA。
14. 弃去柱子，加入 0.7ml Buffer E3 和 0.7ml Buffer ER2 至滤液中，颠倒混匀 10-15 次，冰上放置 10 分钟。42-50°C 温育 5 分钟，室温下，4,000~5,000 rpm 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。
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 15~30 次，室温放置 10 分钟。4°C，8,000 rpm 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 5ml 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，小心吸尽所有残液，不要吸掉 DNA，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。