

MaxPure Plasmid EF Mega Kit

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 < 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.	P1008-01	P1008-02	P1008-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	30 mg	2 x 100 mg
Buffer E1	50 ml	240 ml	2 x 550 ml
Buffer E2	50 ml	240 ml	2 x 550 ml
Buffer E3	50 ml	240 ml	2 x 550 ml
Buffer E4	50 ml	240 ml	2 x 550 ml
Buffer ETR	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer PEW2	6 ml	25 ml	2 x 100 ml
Buffer TE	15 ml	30 ml	120 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
MaxPure Maxi Column	2	10	50
50ml Centrifuge Tubes	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/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至 Buffer PEW2 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。
- LB 培养液和相应的培养瓶。

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 2.5~3L 培养瓶中加入 500ml 含抗生素 LB 培养液，移液器 0.5ml 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 12~14 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。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 15 分钟收集 500ml 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 20 ml Buffer E1/RNase A 至菌体中，高速涡旋重悬细菌。**

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 20ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 10~15 次。**室温放置 3 分钟，其间颠倒混匀 3~5 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 20ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~30 次或直至形成蛋白状悬浊液。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，并稍稍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。
- 取出 Clear Maxi Syringe 的活塞，转移上清液(第 6 步)至针筒中，缓慢插入活塞并推动活塞把溶液过滤到合适的容器中。
- 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液，颠倒 6~8 次，室温放置 5 分钟。按抽滤或离心方式进行操作。

抽滤操作

- 连接好真空泵和真空抽滤盒，把 MaxPure Maxi Column 插到真空抽滤盒的接口处。
- 倒入 20ml 混合液(第 8 步)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。
- 加入 10ml Buffer ETR 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。
- 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 2 分钟，关闭真空泵，让压力下降至零。

离心操作

- 将 MaxPure Maxi Column 套在 50ml 离心管中，转移 20ml 混合液至柱子中，3,000~5000 × g 离心 3 分钟。
- 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，继续转移混合液转移至柱子中，3,000~5000 × g 离心 3 分钟，重复这一步直至所有混和液都转移至柱子中离心完毕。
- 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 10ml Buffer ETR 至柱子中。3,000~5000 × g 离心 3 分钟。
- 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 10ml Buffer PEW2 至柱子中，3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。

13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 5ml 无水乙醇至柱子中。3,000~5,000 x g 离心 3 分钟。

干燥与洗脱

14. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。3,000~5,000 x g 离心 10 分钟。
15. 取下柱子，60℃烘箱中放置 10 分钟晾干柱子滤膜。倒弃收集管中的废液，并在吸水纸轻轻拍打吸弃残液，晾干备用。
16. 把 MaxPure Maxi Column 套在收集管，加入 1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央，静置 3 分钟。4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。
17. 再加入 1.0~1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央，静置 3 分钟。4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

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用附加流程去除短片段 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。

附加流程：进一步纯化质粒 DNA

1. 取质粒 DNA，用 Buffer E1/RNase A 补足 2.6ml，加入 0.4ml Buffer E3，混匀。加入 2.1ml 异丙醇，颠倒混匀 15~20 次。
2. 把混和液分成三分，每份~1.7ml 转移至 2.0ml 离心管中，室温静置 5min，13,000rpm 离心 15min。
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。
3. 小心倒弃上清液，每管加入 1.0ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 rpm 离心 3min。
4. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5min。
5. 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，合并三管 DNA 至 1.5ml 离心管中，保存于-20℃。