

MaxPure Plasmid EF HC Kit

无内小柱大提试剂盒 B (高拷贝)

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
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	20 mg	90 mg
Buffer E1	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E2	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E3	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E4	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer E5	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer TE	3 ml	15 ml	30 ml
Buffer ER2	1.8 ml	1.8 ml	6 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
MaxPure EF Mini Column	2	10	50
2 ml Collection Tubes	2	10	50
50ml Centrifuge Tubes	2	10	50
Extender Tube	2	10	50
Support Tube	2	10	50

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 0.2~1.0ml 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。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

实验步骤

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 0.001 倍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. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集 50~100ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入 5ml Buffer E1/RNase A 混和液，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。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。

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。当菌液用量达 100ml 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，并轻稍振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 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. 取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第 6 步的上清液倒入过滤器中，把活塞插入过滤器，推动活塞使中和液过滤到 50ml 离心管(自配)中。

8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4(~4.5ml)，颠倒混匀 6-8 次。

颠倒混匀时，避免产生大量的气泡。

9. 把 Extender Tube 插到 MaxPure EF Mini Column 中，并装在 Support Tube 中，最后再一起放到 50ml Centrifuge Tubes 中。

为防止柱子从 Extender Tubes 和 CFDNA 柱子的侧壁流出，把 Extender Tubes 用力插到柱子中，不要使用其它 50ml 离心管。当 Extender Tube, CFDNA Column 和 Support Tubes 放到 50ml 离心管中后，有 2-3mm 突出，在操作第 10-11 步时，盖上盖子，用力下压并旋紧盖子。

10. 转移一半体积的混合液至柱子中，盖上离心管的盖子，3,000 rpm 离心 5 分钟。

11. 倒弃废液，把柱子套回离心管中，把剩余的混合液转移至柱子中，盖上盖子。3,000 rpm 离心 5 分钟。

12. 倒弃废液，把柱子套回离心管中。加入 2ml Buffer E5 至柱子中，3,000~5,000 rpm 离心 3 分钟。

13. 加入 6ml Buffer PW2 至柱子中，静置 1 分钟，3,000~5,000 rpm 离心 3 分钟。

14. 去除延长管，支撑管和离心管。把柱子装到 2ml 收集管，13,000 xg 离心 2 分钟。按转染级质粒方案或无内毒素质粒方案进行操作。

转染级质粒方案

15. 把柱子套在 2ml 离心管中，加入 150~250 μ l Buffer TE 或灭菌水至柱子中。静置 3 分钟，13,000 \times g 离心 2 分钟。

● 这一步得到的质粒 DNA 可以直接用于细胞转染，但不建议用于动物注射或敏感细胞转染。附加流程用 Buffer ER2 (Triton X-114) 抽提进一步降低内毒素水平后，可以用于动物注射和高敏细胞转染。

● 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无内毒素质粒方案可以去除短片段 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。

无内毒素质粒 (<0.1EU/ μ g)

15. 把柱子套在 2ml 离心管，加入 500 μ l 灭菌水至柱子中，13,000 \times g 离心 1 分钟。

16. 弃去柱子，加入 300 μ l Buffer E1/RNase A 和 200 μ l Buffer E3 至滤液中，混匀。

17. 加入 100 μ l Buffer ER2 至样品中，颠倒 6-8 次，冰上或 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 10 分钟，其间颠倒数次。室温下，13,000 \times g 离心 10 分钟，转移上清液至新的离心管中。

若用于动物注射，建议重复第 16 步两次以达到超低内毒素水平。低温下，Buffer ER2 溶于水并与内毒素分子结合。超过 15 $^{\circ}$ C 时，Buffer ER2 和内毒素会形成液滴状且不溶，离心后在管底形成红色液层。若实验室温度低于 15 $^{\circ}$ C 时，冰浴后，37~50 $^{\circ}$ C 温育 3 分钟后再离心。若离心后没有分层，37~50 $^{\circ}$ C 度温育 3 分钟，重复离心步骤并确保离心机恢复至室温。

18. 加入 700 μ l 异丙醇至上清液，颠倒混匀 10~15 次。13,000 \times g 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。

19. 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 3min。

20. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5min。

21. 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。