# MaxPure Plasmid EF HC Kit C

## 无内小柱大提试剂盒 C

本产品适合于从 100~200ml 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 | P1233-01 | P1233-02 | P1233-03 |
|---|---|---|---|
| 包装次数 | 2 次 | 10 次 | 50 次 |
| RNase A | 5 mg | 20 mg | 90 mg |
| Buffer E1 | 20 ml | 90 ml | 450 ml |
| Buffer E2 | 20 ml | 90 ml | 450 ml |
| Buffer E3 | 20 ml | 90 ml | 450 ml |
| Buffer E4 | 20 ml | 90 ml | 450 ml |
| Buffer ETR | 6 ml | 30 ml | 150 ml |
| Buffer EWB | 6 ml | 30 ml | 150 ml |
| Buffer PW2* | 10 ml | 20 ml | 100 ml |
| Buffer TE | 3 ml | 15 ml | 30 ml |
| 中量过滤器 | 2 | 10 | 50 |
| 纯化大柱 FE5 | 2 | 10 | 50 |
| 50ml Centrifuge Tubes | 2 | 10 | 50 |

版本号：202501

## 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。
- 以下离心可用水平或角度离心机，水平或桶状离心机速度调整至：4000-5000rpm，角度离心机速度调整至：6000-8000rpm。

## 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 500-1000ml 培养瓶加入 100~200ml 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 14-16 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 x 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 80ml。

3. **4,000~8,000rpm 离心 10 分钟收集◆100~150ml（高拷贝）或●150~200ml 菌液（中低拷贝），倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**
   超高拷贝载体（1ml 菌液含 8-15ug 质粒）时，菌液用量为 100ml。进行抽滤操作时，建议菌液用量 100ml，以减少堵柱的风险。

4. **加入◆7ml 或●8ml 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◆7ml 或●8ml 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 4 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 200ml 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◆7ml 或●8ml 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，4,000~8,000 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 200ml 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，颠倒混匀 10~15 次，按离心操作或抽滤操作。**

**离心操作**

9. **把纯化大柱 FE5 装到 50ml Centrifuge Tubes 中。**

10. **转移不超过 15ml 混合液至柱子中，盖紧盖子，4,000~8,000rpm 离心 3 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，盖紧盖子，4,000~8,000 rpm 离心 3 分钟。**

12. **倒弃废液，把柱子套回离心管中。加入 2.5ml Buffer ETR，4,000~8,000 rpm 离心 3 分钟。**

13. **倒弃废液，把柱子套回离心管中。加入 2.5ml Buffer EWB，4,000~8,000 rpm 离心 3 分钟。**

14. **倒弃废液，把柱子套回离心管中。加入 5ml Buffer PW2，盖上盖子，4,000~8,000 rpm 离心 10 分钟。**

15. **倒弃废液，把 50ml 离心管反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽收集管中残液，室温放置 10 分钟干燥离心管，取出柱子，室温放置 10 分钟干燥柱子。**

16. **把柱子套在 50ml 离心管中，加入 250~500μl Buffer TE 或灭菌水至柱子中，静置 1 分钟，4,000~8,000 rpm 离心 3 分钟。把洗脱产物转移至 1.5ml 离心管中，待用或保存于-20oC。**

    柱子有~50μl 洗脱液残留，加入 250μl 洗脱时实得 200μl 洗脱产物。若需要获得更高产量，建议再加入 150-250μl Buffer TE 或灭菌水进行第二次洗脱。

    质粒总量超过 1.5mg 时，洗脱时柱子会因滤膜内部高浓度质太粘稠会造成堵柱，洗脱液无法离心甩出。柱子堵塞时用移液枪头刺破滤膜后再离心，并重复 2 次洗脱（每次加入 200μl 洗脱液），最后转移洗脱液至 1.5ml 离心管中，13000 x g 离心 5 分钟去除脱落的滤膜，把上清液转移至 1.5ml 离心管中。

    更方便操作，50ml 离心管中放入 5ml 离心管，然后插入纯化大柱 FE5，并让柱子底部对准并插入离心管中来收集洗脱液，离心后小心取出 5ml 离心管。

**抽滤操作：**建议不超过 100ml 菌液，抽滤力量较少，过量菌液会造成柱子堵塞。

9. **把纯化大柱 FE5 插到真空抽滤盒接口处。**

10. **把混合液（第 8 步,一次不要超过 18ml）转移或倒入柱子中，打开真空泵进行抽滤，继续加入混合液至柱子进行抽滤（及时加入混合液，不要让柱子空抽），当液体全部过滤完毕后，**关闭真空泵，让压力下降为零。
    纯化大柱 FE5 一次最多能装 18ml，多余溶液分两次转入，当柱子有足够空间时，立即加入余下混合液，不要让柱子空抽，空抽时会产生大量气泡引起过滤速度变慢，这一步需要 3~15 分钟才能让全部滤液过滤完毕。当质粒总量达到 0.8mg 时，可能会有堵柱现象，取下柱子装入 50ml 离心管中按离心方案进行过柱，以确保全部滤液都过滤完毕，余下清洗步骤也用离心操作。

11. **加入 2.5ml Buffer ETR 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体完全过滤完结后，关闭真空泵。**

12. **加入 2.5ml Buffer EWB 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体完全过滤完结后，关闭真空泵。**

13. **加入 5ml Buffer PW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体完全过滤完结后，继续抽滤 10 分钟让柱子干燥，关闭真空泵，让压力下降为零。**

14. **按离心方案的第 16 步洗脱出 DNA。**

## 质粒的重沉淀除 RNA

中低拷贝载体如慢病毒/线病毒载体，>8KB 载体，或质粒含量低于 3ug/ml LB 培养过夜菌液，易有 RNA 污染造成 OD 浓度虚高，部分载体会虚高 1~3 倍。由于污染 RNA 片段很短，电泳时多数不可见（无明显条带），但能发现电泳后 DNA 条带亮度与 OD 浓度不相符。用异丙醇沉淀纯化，OD 浓度会显著下降回归正常，这是因为短片段 RNA 不能有效沉淀而去除，特别是低拷贝载体更为明显。异丙醇能高效沉淀质粒 DNA，回收率超过 85%，并不会引起质粒 DNA 明显产量下降。

1. **取质粒 DNA 至 2.0 ml 离心管中，加入灭菌水至 800ul，加入 200ul Buffer E3 至总体积为 1ml，颠倒混匀。**

2. **加入 700ul 异丙醇，颠倒混匀 10-15 次，室温静置 3min，13,000rpm 离心 10min。**
    离心后，DNA 沉淀有可能看不到，特别是中低拷贝数载体，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。若 DNA 沉淀粘附不紧，取出离心管再颠倒数次让沉淀从管壁上脱落，再重复离心，离心可以在常温进行也可以在 2-8oC 进行。

3. **小心倒弃上清液，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 Buffer TE，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒 DNA 充分溶解。