

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 1L 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 10mg，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.	P1117-01	P1117-02	P1117-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	20 mg	60 mg	5 x 60 mg
Buffer E1	120 ml	550 ml	5 x 550 ml
Buffer E2	120 ml	550 ml	5 x 550 ml
Buffer E3	120 ml	550 ml	5 x 550 ml
Buffer E4	100 ml	500 ml	5 x 500 ml
Buffer E5	120 ml	550 ml	5 x 550 ml
Buffer ATL	30 ml	150 ml	550 ml
MaxPure Giga Column	2	10	10
Clear Maxi Syringe	2	10	10
Clear Midi Syringe	2	10	10
50ml Centrifuge Tubes C	2	10	10

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稀释 Buffer PW2 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 5L 培养瓶中加入 1000ml 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 12~14 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 1000ml 菌液。倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。

若有大型高速离心机时，8000rpm 离心 3 分钟收集细菌。

4. 加入 45ml 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 45ml 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 45ml 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 10 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。若有大型高速离心机时，8000rpm 离心 10 分钟。

7. 取出 Clear Maxi Syringe 的活塞，转移 60ml 上清液(第 6 步)至针筒中，插入并推动活塞把溶液过滤到合适容器。缓慢拔出活塞，再把余下上清液转移至针筒中，插入并推动活塞把溶液过滤到合适的容器中。

若拔出活塞时，内环或滤膜有轻动时，再推入活塞压紧内环和滤膜，然后慢慢地缓缓地拔出活塞，不要让滤膜和内环松动。

8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液，颠倒 10~15 次，静置 5 分钟。

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和洗脱，计算出 DNA 的产量，最后按体积换算出大柱的产量。

9. 连接好真空泵和抽滤盒，把 MaxPure Giga Column 插到真空抽滤盒的接口处。

10. 倒入 60ml 混合液(第 8 步)柱子中，打开真空泵进行抽滤，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。

当柱子中余下 5~10ml 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 45ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，抽滤完毕后关闭真空泵。
12. 取下 MaxPure Giga Column 放入合适架子上，加入 10ml Buffer ATL 和 5ml Buffer E1/RNase A 至柱子中，轻轻振荡混匀，缓慢插入活塞并慢慢推动活塞，挤出洗脱液至合适的瓶子或 50ml 离心管（自备）。

用活塞推动时，约为 2ml 洗脱液残留在膜上无法得到挤出。由于加入足够的洗脱液，损失的 2ml 洗脱液只占了少量的 DNA。
13. 颠倒混匀滤液 10-15 次，室温静置 5 分钟。
14. 加入 5ml Buffer E3 至滤液，颠倒混匀 15-20 次。
15. 取出 Clear Midi Syringe 的活塞，转移全部混合液至针筒中，插入并推动活塞把溶液过滤到 50ml Centrifuge Tubes C 中。
16. 加入 0.8 倍体积异丙醇至滤液中，颠倒混匀 15~30 次，室温放置 10 分钟。4°C, 8,000rpm 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。
17. 倒弃上清液，加入 10ml 75%乙醇，涡旋 5 秒，颠倒 10 次，4°C, 8,000rpm 离心 10min。
18. 小心倒弃上清液，短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 10min。
19. 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。