

MaxPure Plasmid EF HC Kit

低内毒素质粒小提大量试剂盒

本产品适合于从 50~75ml 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 1mg，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	P1231-01	P1231-02	P1231-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	6 ml	33 ml	170 ml
Buffer E2	6 ml	33 ml	170 ml
Buffer E3	6 ml	33 ml	170 ml
Buffer E4	6 ml	33 ml	170 ml
Buffer E5	10 ml	10 ml	35 ml
Buffer PW2*	6 ml	6 ml	20 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	30 ml
Buffer ER2	1.8 ml	3 ml	5 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
MaxPure EF Mini Column Set	2	10	50
2 ml Collection Tubes	2	10	50
Buffer EP4(升级附送)	6 ml	33 ml	170 ml

注：Extender Tube, Support Tube, MaxPure EF Mini Column 以及 50ml Centrifuge Tube 装配在一起。

*: Buffer EP4 升级说明(201907): 我司经过反复对比测试发现，升级后的 Buffer EP4 可以明显减少 RNA 污染，并提升中低拷贝载体的质粒得率。考虑到产品延续性，我司暂时不取消 Buffer E4，并将升级后 Buffer EP4 附送到产品中。使用时，只需要将 Buffer EP4 代替 Buffer E4 即可，若需对比测试数据，可联系我们。

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 0.2~0.5ml 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。
- 灭菌的 1.5ml 离心管，用于收集 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 低温下，Buffer E4 有沉淀析出，于 55℃水浴溶解。

实验步骤

1. 将含目的质粒的菌种接种于含有 1ml LB/抗生素培养基的 10ml 培养管中，37℃摇床培养 6~8 小时小量扩增菌液。
2. 在 200ml 培养瓶中加入 50~75ml 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 14~16 小时扩增菌液。
不要用 TB 或 YT 等丰富培养基进行培养细菌。使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。
3. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 50~75ml 菌液。
4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。加入 3.0ml Buffer E1/RNase A，高速涡旋重悬细菌，室温放置 5~10 分钟。
5. **涡旋 5 秒重悬细菌，加入 3.0ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。**室温放置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀 2~3 次。
轻轻颠倒混匀，不要涡旋。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。处理多个样品时，总操作时间不要超过 4 分钟。
6. **加入 3.0ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 10~15 次或直至样品充分混匀。**
加入 Buffer E3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。菌液用量较多时，中和也会较难进行，中和时需要稍用力颠倒数次至溶液彻底中和。

7. 3,000~5,000 × g 离心 5~10 分钟。
8. **取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第七步的上清倒入过滤器中（倒入沉淀不影响结果）。**把过滤器的出水口对准已准备好的 15ml 离心管。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 15ml 离心管中。
9. **测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4(~2.7ml)，颠倒混匀 6~8 次。**
10. 取出 MaxPure EF Mini Column Set，用力把最上部的管子(延长管)插紧到吸附柱中(红色)，然后再放回 50ml 离心管中。(运输过程可能会引起延长管与吸附柱接触不紧，造成第 11 步的混合液从柱子的侧边流出，而引起产量急剧下降。)
11. **把第 9 步获得的混合液全部至 MaxPure EF Mini Column Set 中，盖上盖子。**2,000 × g 离心 3~5 分钟。
12. 丢去延长管、底部的支撑管和 50ml 离心管，以及密封圈，只保留吸附柱。
13. 把 MaxPure DNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**加入 600µl Buffer E5 至柱子中。**10,000 × g 离心 1 分钟。
14. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。**加入 650µl Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，静置 2 分钟，**10,000 × g 离心 1 分钟。
15. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。**加入 650µl Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，**10,000 × g 离心 1 分钟。
16. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟甩干柱子。
17. **把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中(自备)。**加入 50~300µl Buffer TE 至柱子膜中央。静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。
洗脱体积应根据质粒的拷贝数进行调整。对于 2µg/µl 的质粒，应加大洗脱体积或进行第二次洗脱。

附加方案:超低内毒素质粒提取(<0.02EU/µg Plasmid)

1. 取上述方案得到的质粒 DNA，加入 300~1000µl Buffer E1/RNase A 将质粒浓度稀释至 0.1~0.3µg/µl。
2. **加入 0.1 倍体积的 Buffer E3 和 0.1 倍体积的 Buffer ER2，**涡旋混匀 10 秒，冰上放置 10 分钟。

3. 42 度水浴 3 分钟。13,000 x g 离心 3 分钟。
4. 小心转移上清液至新的离心管中，加入 0.9 倍异丙醇，颠倒混匀 15~30 次。13,000 x g 离心 5 分钟。
5. 吸弃上清，加 0.7ml 70%乙醇，涡旋混匀 5 秒。13,000 x g 离心 1 分钟，吸弃上清。
6. 短暂离心，吸弃所有的溶液，空气干燥 5 分钟。加入 50~200 μ l Buffer TE 溶解质粒 DNA。

常见问题

1. DNA 产量低

- **质粒拷贝数：**载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2~3 倍的产量波动，(每毫升培养过夜的菌液，高拷贝数的质粒载体产量为 4~16 μ g)。长片段质粒(>8KB)和表达型载体常以中低拷贝数为主，每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μ g。
- **菌种问题：**菌种保存过程中存在质粒丢失现象，养菌前最好先划线活化，以稳定产量。
- **细胞未充分裂解：**细菌须在 Buffer E1 /RNase A 中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **低温离心：**加入 Buffer E4 后，不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误：**Buffer E4 不能低温放置，Buffer E2/E4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PV2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer E4 体积：**Buffer E4 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer E4 会导致产量的波动。

2. RNA 污染

- **RNase 的用量和保质期：** RNase A 保存于 2~8 度，长期保存时放置于-20 度。
- **菌液培养时间：**本产品对 RNA 污染较为敏感，建议细菌培养时间为 12-16 小时，以降低菌液中 RNA 的丰度。
- **去除 RNA 污染：**处理某些菌液时，得到的质粒可能存在 RNA 污染，通过醇类重沉淀可以去除 RNA。