

## 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 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	11 ml	60 ml	270 ml
Buffer E2	11 ml	60 ml	270 ml
Buffer E3	11 ml	60 ml	270 ml
Buffer E4	11 ml	60 ml	270 ml
Buffer E5	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer TE	5 ml	15 ml	30 ml
Buffer ER2	1.8 ml	3 ml	5 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
Sealing Ring	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 P1 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 P1 中，于 2-8℃保存，有效期为 6 个月。
- 灭菌的 2.0ml 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 小时少量扩增菌液。
2. 在 500ml 培养瓶中加入 100ml 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. 4,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 100ml 菌液。  
处理低拷贝数菌种，菌液用量可以高达 150ml。处理高拷贝数载体时，菌液用量不要超过 100ml。若产量超过 1.0mg 时，第 15 步容易发生堵柱现象，减少菌液用量可避免堵柱现象。
4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**加入 5ml Buffer E1/RNase A**，涡旋重悬细菌。  
彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。
5. **加入 5ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。**室温放置 3 分钟，其间偶尔颠倒混匀 3~5 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 5ml 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. 4,000~5,000 × g 离心 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准备好的 50ml 离心管。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 50ml 离心管中。
9. **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。处理低拷贝载体，建议只加入 1/4 体积的 Buffer E4。减少 Buffer E4 用量有利于提高产量，但有可能带来更多的 RNA 污染。
10. 取出 MaxPure EF Mini Column，用力把 Extender Tube(延长管)插到吸附柱中，把 Sealing Ring(密封圈)套在柱子的中部，放到 Support Tube(支撑管)管子中，最后再一起装到 50ml Centrifuge Tubes(50ml 离心管)中。
11. **转移一半体积的混合液至 MaxPure EF Mini Column Set 中，盖上盖子。**3,000 × g 离心 3 分钟。
12. 小心取出柱子，倒弃废液，把柱子套回离心管中，把余下的混合液转移至柱子中，盖上盖子。
13. 3,000 × g 离心 3 分钟。
14. 小心取出柱子，倒弃废液，把柱子套回离心管中。**加入 2ml Buffer E5 至柱子中，3,000 × g 离心 3 分钟。**
15. **加入 6 ml Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，静置 1 分钟，3,000 × g 离心 3 分钟。**取出柱子，去除延长管，密封圈和支撑管。
16. 把柱子装到 2ml 收集管中，13,000 ~16,000 × g 离心 2 分钟。
17. **把柱子套在 2ml 离心管中，加入 100~300µl Buffer TE 至柱子中。静置 3 分钟。**  
13,000~16,000 × g 离心 2 分钟。  
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。本产品处理低拷贝数载体时，容易出现 RNA 污染，建议用浓缩步骤去除 RNA 污染。若进行浓缩和进一步去除内毒素时，洗脱体积可以加至 300~500µl。

#### 附加方案:超低内毒素质粒提取(<0.02EU/µg Plasmid)和去除 RNA 污染

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 0.2~0.5µg/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。42 度水浴 3 分钟。13,000 x g 离心 3 分钟。

3. 小心转移上清液至新的离心管中，加入 0.7 倍异丙醇，颠倒混匀 15~30 次。13,000 x g 离心 5 分钟。
4. 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。
5. 短暂离心，吸弃所有的溶液，空气干燥 5 分钟。加入 50~200 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。
- **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。