

MaxPure Plasmid EF Giga Kit B

低内质粒宏量试剂盒 B

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 10L 细菌培养液中提取低内毒素质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 100mg，内毒素含量低于 0.1EU/ug，可直接用于细胞转染和动物注射等。120 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.	P1118-01	P1118-02	P1118-03
包装次数	1 次	5 次	10 次
RNase A	40 mg	210 mg	420 mg
RNase Storge Buffer	1 ml	3 ml	5 ml
Buffer E1	420 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer E2	420 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer E3	420 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer E4	420 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer E5	180 ml	800 ml	1700 ml
Buffer PEW2	50 ml	200 ml	400 ml
Buffer ERS1	11 ml	60 ml	120 ml
Buffer ERS2	11 ml	60 ml	120 ml
Buffer TE	60 ml	350 ml	700 ml
除杂漏斗	1	5	10
吸附漏斗	1	5	10
橡胶塞	1	1	2

版本号：202510

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。
- 溶解 RNase A：加入适量的 Protease Dissolve Buffer 于 RNase A 干粉中至终浓度为 100mg/ml，颠倒混匀使之充分溶解，保存于-20 度。
P1118-O1：加入 0.4ml Protease Dissolve Buffer.
P1118-O2：加入 2.1ml Protease Dissolve Buffer.
P1118-O3：加入 4.2ml Protease Dissolve Buffer.
- LB 培养液和相应的培养瓶
- 2L 三角抽滤瓶，瓶口直径 38-42mm。

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 50L 培养罐中加入 10L 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 14~16 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 50mg，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 20 分钟收集 10 L 菌液。倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打

吸尽残液。

4. 加入 400 ml Buffer E1 和 0.4ml RNase A (100mg/ml) , 高速涡旋或吸打重悬细菌。

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 400 ml Buffer E2 至重悬液中, 颠倒混匀 10~20 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 400 ml Buffer E3 至裂解液中, 立即颠倒混匀 15~20 次或直至形成蛋花状悬浊液。
4,000~5,000 x g 离心 20 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。

7. 取出除杂漏斗并装到抽滤瓶中, 把上清液 (一次不超过 180ml) 分次转移至漏斗中, 打开真空泵进行抽滤, 弃去除杂漏斗。

8. 测量滤液体积, 转移至 3~5L 的烧杯或瓶子中, 加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液, 用磁力搅拌器搅拌 3 分钟 (也可以颠倒混匀 10-15 次) 进行充分混匀。

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 (P1001C) 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. 取出结合漏斗并装到抽滤瓶中, 把混合液 (一次不超过 180ml) 分次转移至漏斗中, 打开真空泵进行抽滤直到所有混合液都从柱子过滤完毕, 关闭真空泵。

结合漏斗使用前, 用电子天平称取和记录下结合漏斗的重量。

10. 取出结合漏斗, 倒弃抽滤瓶的液体, 再把结合漏斗装回抽滤瓶中。

11. 加入 150 ml Buffer E5 至漏斗中, 打开真空泵进行抽滤, 抽滤完毕后不要关闭真空泵。

12. 加入 150 ml Buffer PEV2 至漏斗中, 抽滤完毕后不要关闭真空泵。

13. 加入 50 ml 无水乙醇至漏斗中, 抽滤完毕后, 再继续空抽 15~20 分钟干燥柱子的滤膜。

取下结合漏斗用电子天平称取结合漏斗重量, 若重量差超过 0.3g, 则继续抽滤干燥滤膜。

14. 取出结合漏斗，倒弃抽滤瓶的液体，并用灭菌水清洗抽滤瓶 2~3 次。
15. 再把结合漏斗装回抽滤瓶中，先加入 10ml Buffer TE 至滤膜上，打开真空泵 5~10 秒让 Buffer TE 充分浸润滤膜，关闭真空泵，
16. 当压力完全下降至零后，加入 50ml Buffer TE 至漏斗，浸泡 5 分钟，打开真空泵并立即关闭，让洗脱液缓慢流出，当溶液不流出后，再打开真空泵并立即关闭，每次只提供少量负压，让洗脱液缓慢流出，反复几次后，当滤膜表面溶液抽完后，打开真空泵进行抽滤 3~5 分钟，无液体流出后，用力拍打结合漏斗数次让粘附在漏斗内壁的洗脱液流出。
这一步可以收集 50ml 洗脱液，约有 10ml 洗脱液被滤膜和漏斗内壁粘附，若需要获得更高产量，可以再加入 10~20ml Buffer TE 进行二次洗脱。这一步得到的质粒 DNA 可以直接用于各种细胞转染。
17. 弃去结合漏斗，转移滤液至合适离心管中，加入 0.2 倍滤液体积的 Buffer ERS1，颠倒混匀 10~15 次，室温放置 10~15 分钟，其间颠倒混匀数次。
18. 加入 0.2 倍滤液体积的 Buffer ERS2，颠倒混匀 10~15 次，室温下，10000rpm 离心 10 分钟萃取分层，下层为红色的内毒素溶液，上层为无色的质粒 DNA 溶液。
为方便操作，可以把混合液分装到两个 50ml 高速离心管中。
19. 转移上清液至新离心管中，加入 0.7 倍上清液体积的异丙醇，颠倒混匀 20~30 次，室温放置 10 分钟。4°C, 10000rpm 离心 20 分钟沉淀质粒 DNA，倒弃上清液。
20. 加入 10 ml 75%乙醇，涡旋混匀 10 秒，4°C, 10000rpm 离心 10 分钟。
21. 倒弃上清液，短暂离心，吸弃所有残液（不要吸到沉淀），室温干燥 10 分钟。
22. 加入适量的灭菌水或无内毒素水溶解溶解质粒 DNA。