

MaxPure Plasmid EF 10L 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 10~15L 细菌培养液中提取低内毒素质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 200mg, 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。

产品组分

Cat.No.	P1118-01	P1118-02	P1118-03
包装次数	1 次	5 次	10 次
RNase A	50 mg	220 mg	440 mg
RNase Storage Buffer	1 ml	3 ml	5 ml
Buffer E1	410 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer E2	410 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer E3	410 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer E4 Plus	410 ml	2200 ml	4400 ml
Buffer ETR	160 ml	800 ml	1600 ml
Buffer PEW2	50 ml	200 ml	400 ml
Buffer ER2	6 ml	30 ml	50 ml
Elution Buffer (Endo-Free)	60 ml	250 ml	500 ml
除杂漏斗	1	5	10
DNA 结合漏斗	1	5	10
橡胶塞	1	1	2

版本号: 202601

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 Plus 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 PEW2 瓶子中于室温保存。
- 溶解 RNase A：加入适量的 RNase Storage 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 RNase Storage Buffer.
P1118-O2：加入 2.1ml RNase Storage Buffer.
P1118-O3：加入 4.2ml RNase Storage 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。
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中可能会丢失载体，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 10~15L 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 10~15 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 10~15 次, 室温放置 3 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, 并轻微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三角抽滤瓶中, 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 Plus, 用磁力搅拌器搅拌 3 分钟或颠倒混匀 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三角抽滤瓶中, 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. 加入 150 ml Buffer ETR 至结合漏斗中进行抽滤, 滤完后再次抽滤 5 分钟, 且不要关闭真空泵。
11. 加入 150 ml Buffer PEV2 至漏斗中, 抽滤完后不要关闭真空泵。
12. 加入 50 ml 无水乙醇至漏斗中, 滤完后, 再继续空抽 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。
13. 取出结合漏斗并装到干净的三角抽滤瓶中, 加入 10ml Eluitor Buffer 至滤膜上, 打开真空泵

5~10 秒让 Elution Buffer 充分浸润滤膜，关闭真空泵，并让压力下降至零。

14. 加入 40ml Elution Buffer 至结合漏斗，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黏附在漏斗内壁的洗脱液流出。

约 10ml 洗脱液被滤膜和漏斗内壁黏附，这一步得到的质粒 DNA 可以直接用于各种细胞转染。50ml 可以洗脱出 70-80% DNA。

15. 转移洗脱液至新的离心管中，保存于-20°C 待用，或按附加流程或其他方法进行纯化去除残留内毒素。

附加流程：无内毒素质粒 DNA (0.1EU/μg)

1. 取质粒 DNA 至合适离心管，加入适量灭菌水至总体积为 40ml，加入 2 ml Buffer E1/RNase，颠倒混匀数次，室温静置 15~20 分钟降解残留 RNA。
2. 加入 4.2 ml Buffer ER2，涡旋混匀 10 秒，冰上或 2-8°C 冰箱放置 15~30 分钟，其间颠倒数次。45~55°C 温育 10 分钟沉淀内毒素形成浑浊液。
低温下，Buffer ER2 溶于水并与内毒素分子结合，超过 15°C 时，Buffer ER2 和内毒素会形成囊泡小体且不溶形成浑浊液。
3. 室温下，10,000 rpm 离心 10 分钟（离心机降速参数调整至最慢）。
离心后管底分层成红色液层，若没有形成分层，颠倒数次，45-50°C 温育 5 分钟再重复离心，确保离心机已完全恢复至室温，并调整离心机的降速参数为最慢下降速度。
4. 转移上清液至新的离心管，加入 0.1 倍体积的 Buffer E3，颠倒混匀，再加入 0.8 倍体积的异丙醇，颠倒混匀 15~30 次，静置 10 分钟。
5. 4°C，10,000rpm 离心 30 min 沉淀质粒 DNA，倒弃上清液。
6. 加入 10 ml 75%乙醇，涡旋 10 秒，4°C，10,000rpm 离心 10 min。
7. 小心倒弃上清液，短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 10~15 min。
8. 加入 Elution Buffer (Endo Free)至沉淀中，混匀，室温放置 10~15min 让质粒充分溶解，保存于-20°C。