

MaxPure Plasmid EF HC Kit

低拷贝质粒小提大量试剂盒

本产品适合于从 20~75ml 细菌培养液中提取高浓度的转染级质粒 DNA。试剂盒采用独特的溶液体系和硅胶膜抽提体系，是专门为低拷贝数载体和超低拷贝数载体而设计的，质粒最高产量可达 100ug，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 1μg/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	P1230-01	P1230-02	P1230-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	5 mg	20 mg
Buffer P1	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer P2	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer LEN3	4 ml	18 ml	90 ml
Buffer LN4	15 ml	80 ml	2 x 200 ml
Buffer EWB	3 ml	10 ml	40 ml
Buffer PW2*	6 ml	6 ml	20 ml
Buffer TE	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
HiPure DNA Mini Column III	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

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 P2/LN4 会有沉淀形成，55℃水浴使沉淀完全溶解后使用。

准备事项

- 加入 0.2~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，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。
- 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。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 低温下，Buffer P2/LN4 有沉淀析出，于 55℃水浴溶解。
- 本产品最高吸附力只能达至 100µg，处理高拷贝数载体菌液不超过 30ml。

实验步骤

1. 将单克隆菌种接种于含 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，用灭菌牙签挑取单菌落接种于 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，用灭菌牙签挑取单菌落进行初步培养。

2. 在◆150ml 培养瓶加入 20~30ml(高拷贝质粒) LB/抗生素培养液；或在■250ml 培养瓶中加入 50-75ml(低拷贝质粒) LB/抗生素培养液，接种 0.001 倍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。培养过夜后可通过菌液密度或 OD600 来判断，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。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，因菌体密度很高，建议不要超过 20ml。纯化柱最大结合力为 100µg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟，收集◆20~30ml 或■50~75ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入 3ml Buffer P1/RNase A 混和液，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。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。
5. 加入 3ml Buffer P2 至重悬液，温和地上下颠倒并转动离心管 10~15 次，室温静置 2 分钟，其间颠倒混匀 6-8 次。
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。当菌液用量达 75ml 时，裂解液会极为粘稠，属于高密度碱裂解类型，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过 5 分钟。
6. 加入 1.5ml Buffer LEN3 至裂解液，上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液，4,000~5,000 rpm 离心 20 分钟。
加入 Buffer LEN3 后应立即上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量达 75ml 时，属于高密度碱裂解类型，中和时会形成大块且紧密的沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让大块沉块团分散成较少的团块，让 Buffer LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。若离心后上清液存在明显的沉淀物，重复离心步骤或提高离心速度至 8000rpm。
7. 转移不超过 7ml 上清液至新的离心管中，加入 7ml Buffer LN4，颠倒混匀 6~8 次。
8. 取出 HiPure DNA Mini Column III，把 Extender Tube (延长管)插到柱子中，然后套在 Support Tube (支撑管)管子中，最后一起装到 50ml 离心管中。
9. 把第 7 步获得的混合液全部倒入 HiPure DNA Mini Column III Set 中，盖紧盖子。3,000 rpm 离心 5 分钟。
10. 丢去 Extender Tube(延长管), Support Tube(支撑管)和 50ml 离心管，保留吸附柱。
11. 把 HiPure DNA Mini Column III 装在 2ml 收集管中。加入 650 μ l Buffer EWB 至柱子中，13,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 把 HiPure DNA Mini Column III 装在 2ml 收集管中。加入 650 μ l Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，13,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 把 HiPure DNA Mini Column III 装在 2ml 收集管中。加入 650 μ l Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，13,000 \times g 离心 1 分钟。

14. 倒弃废液，把柱子套回收集中。13,000 × g 离心 2 分钟甩干柱子。
15. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中(自备)。加入 60~100µl Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央。静置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。
16. 再把洗脱液转移至柱子膜中央。静置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

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 4~16µg)。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 0.5~2µg。
- **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 LN4 后, 不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误**: Buffer LN4 不能低温放置, Buffer E2/LN4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer LN4 体积**: Buffer LN4 加入量是上清体积的等倍。过多或不足的 Buffer LN4 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。