

目 录

简介	2
原理及保质期	2
试剂盒组成	3
1. MaxPure Plasmid EF Mini Kit 方案	5
2. MaxPure Plasmid EF Midi Kit 方案	7
3. MaxPure Plasmid EF Maxi Kit 方案	9
4. 进一步去除内毒素	11
常见问题回答	12

版本: 2021-07 升级

简介

MaxPure Plasmid EF Kits 为质粒小量、中大量、超大量、宏量的超低内毒素质粒提取提供了一条极为方便和经济的解决方案。该系列采用新型的滤膜技术，它能高效地吸收质粒 DNA。在相同滤膜面积的情况下，MaxPure 滤膜的吸附能力比硅胶柱要高出 50-100 倍。操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。此外该系列提供高效的内毒素吸附液(Buffer ER1 和 Buffer ER2)，该吸附液与内毒素分子有着极高的亲和力，能吸附溶液残留的内毒素，最终得到的内毒素含量可低至 0.02EU/ μg ，纯化的质粒 DNA 可直接用细胞转染，动物注射等运用。

原理

MaxPure 采用改良硅胶柱纯化技术。经改良的 MaxPure Column 是常规硅胶柱结合力的 20-50 倍，从而大大方便了质粒的提取工作。MaxPure EF Kits 采用独特的溶液体系，可高效去除内毒素，最终得到的质粒 DNA 内毒素含量可低至 0.02EU/ μg Plasmid，其原理及流程主要包括：

- **碱裂解法处理**

离心收集细菌，加入缓冲液(Buffer E1)重悬细菌，加入碱性裂解液(Buffer E2)裂解细菌，加入中和液(Buffer E3)进行中和，离心或过滤去除蛋白质和基因组 DNA 沉淀，得到含质粒 DNA 的上清液。

- **硅胶柱吸附**

上清液与结合液混合后转移至改良硅胶柱(MaxPure)中，经离心或负压抽滤过滤，质粒 DNA 就会结合至硅胶柱的基质上，而蛋白质、RNA 分子、内毒素分子和其它杂质不吸附随溶液一起滤出。

- **洗涤除盐和洗脱出核酸**

硅胶柱吸附质粒后，经洗涤液洗涤去除杂质和内毒素，最后用灭菌水洗脱出质粒 DNA。洗脱出来的 DNA 可直接用于绝大部分的细胞转染和动物注射。

- **[可选]进一步去除内毒素**

洗脱出来的质粒经 Buffer ER1 和 ER2 溶液抽提后，可进一步去除内毒素。然后用异丙醇沉淀浓缩质粒 DNA，最后灭菌水溶解。这一步得到的质粒内毒素含量可低至 0.02EU/ μg ，可用于各种敏感的转染和注射实验。

组 成

MaxPure Plasmid EF Mini Kit

Cat.No.	P1220-01	P1220-02	P1220-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A *	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E3	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer EP4	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E5	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PW2	6 ml	20 ml	50 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	60 ml
Buffer ER2	1 ml	5 ml	20 ml
MaxPure Mini Column	10	50	250
2 ml Collection Tubes	10	50	250

MaxPure Plasmid EF Midi Kit

Cat.No.	P1221-01	P1221-02	P1221-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E3	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer EP4	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E5	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PW2	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer TE	3 ml	20 ml	110 ml
Buffer ER2	5 ml	5 ml	30 ml
MaxPure Midi Column	2	10	50
1.5 ml Collection Tubes	2	10	50

组 成

MaxPure Plasmid EF Maxi Kit

Cat.No.	P1222-01	P1222-02	P1222-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	60 mg	170 mg
Buffer E1	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer E2	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer E3	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer EP4	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer E5	50 ml	120 ml	550 ml
Buffer PW2	20 ml	50 ml	2 x 100 ml
Buffer TE	15 ml	60 ml	250 ml
Buffer ER2	2 ml	10 ml	40 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
MaxPure DNA Maxi Column	2	10	50
50 ml Collection Tube	2	10	50

保 质 期

MaxPure 质粒提取试剂盒可在室温下 (15~25℃) 干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。RNase A 采用室温运输和保存, 收到产品后, 建议把 RNase A 放置 -20~8℃ 保存。低温下, Buffer E2 和 Buffer EP4 溶液可能会有沉淀形成, 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。当 RNase A 加到 Buffer E1 后, 可在 2~8℃ 保存 6 个月。

1. MaxPure Plasmid EF Mini Kit 方案(P1220)

该方案适合于从 5-15ml 细菌培养液中提取 10-200 μ g 超低内毒素的质粒 DNA。

准备条件

- 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，把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 中，于 2-8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 6 个月。
- 按瓶子标签所示，加入适量无水乙醇至 Buffer PW2 中，于室温保存。
- 灭菌的 1.5ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

1. 将菌种接种于含有 5~15ml LB/抗生素培养液的培养瓶中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 小时。

甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线挑取单菌落进行小量扩增，不要直接用甘油保藏菌种进行培养。培养瓶的体积必须大于或等于培养液体积的 4 倍。

2. 3,000~5,000 \times g 离心 10 分钟，收集 5~15ml 菌体。

3. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸轻轻拍打以吸尽残液。加入 500 μ l Buffer E1/RNase A 至菌体中，涡旋重悬细菌。把细菌重悬液转移至 2ml 离心管中。

使用前，必须确保 RNase A 已经加到 Buffer E1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。

4. 往重悬液中加入 500 μ l Buffer E2，颠倒混匀 10~15 次。静置 1~2 分钟，其间颠倒几次。

轻轻颠倒混匀，不要涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。菌液用量较多时，裂解液会很粘稠而难混匀。如有必要，可一直缓慢颠倒混匀至裂解液变得粘稠而透亮，但这一步操作时间不要超过 4 分钟。

5. 往裂解液中加入 500 μ l Buffer E3，立即颠倒混匀 15~20 次。

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。混匀过程必须轻柔而充分。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。充分中和标准是：溶液变得不粘稠，沉淀物分散显白色，若沉淀物中仍含有许多黄色物质，就表明溶液没有充分中和。

6. 13,000 \times g 离心 10 分钟。

7. 转移上清液至新的离心管中。**加入 1/3 倍体积 Buffer EP4 至上清液中**，颠倒混匀 10~15 次。
8. **将 MaxPure Micro Column 套在 2ml 收集管中。转移 700 μ l 混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。**继续转移 700 μ l 混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。重复此步直至所有混合液都转移至柱子中离心过滤。
10. 倒弃滤液把柱子套回收集管中。**加入 600 μ l Buffer E5 至柱子。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子套回收集管中。**加入 600 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子，静置 2 分钟。**8,000 \times g 离心 30~60 秒。
使用 Buffer PW2 之前，须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签所示。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管中。13,000 \times g 离心 3 分钟。
13. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。**加入 30~200 μ l Buffer TE 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。
若需高浓度的质粒 DNA，加入 30~100 μ l 灭菌水洗脱，这一步得到的质粒 DNA 可直接用于常规的细胞转染和动物注射，测序等。若下游运用对内毒素较为敏感时，可按方案 7 操作进一步去除内毒素。经方案 7 抽提后，质粒的内毒素含量可低至 0.02EU/ μ l Plasmid。处理低拷贝数的载体，可能存在 RNA 污染，建议按方案 4 处理，可以去除 RNA 污染。

2. MaxPure Plasmid EF Midi Kit 方案(P1221)

该方案适合于从 15~50ml 细菌培养液中提取 10~500 μ g 质粒 DNA。

准备条件

- 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，把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 中，于 2-8 $^{\circ}$ C 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 瓶子中于室温保存。
- 灭菌的 15ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

1. 将含质粒的菌种接种于含有 1ml LB/抗生素培养液的培养管中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 8 小时扩增菌种。

甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线培养后挑取单菌落进行小量扩增，不要直接用甘油保藏菌种进行培养。培养瓶或培养管的体积必须大于或等于培养液体积的 4 倍。

2. 在 200ml 培养瓶中加入 15~50ml 含抗生素 LB 培养液，接种 1/1000 初级菌液至培养瓶中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 小时。
3. 3,000~5,000 \times g 离心 10 分钟，收集 15~50ml 菌液。

4. 倒弃培养液，并反扣于吸水纸上吸尽残液。**加入 2.5ml Buffer E1/RNase A 至菌体中，涡旋充分重悬细菌。**

使用前，必须确保 RNase A 已经加到 Buffer E1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。

5. **往重悬液中加入 2.5ml Buffer E2，颠倒混匀 10~12 次。**静置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀几次。

轻轻颠倒混匀，不要涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。菌液用量较多时，裂解液会很粘稠而难混匀。如有必要，可一直缓慢颠倒混匀至裂解液变得粘稠而透亮，但这一步操作时间不要超过 4 分钟。

6. **往裂解液中加入 2.5ml Buffer E3，立即颠倒混匀 15~20 次。**

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。混匀过程必须轻柔而充分。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。充分中和标准是：溶液变得不粘稠，沉淀物分散显白色，若沉淀物中仍含有许多黄色物质，就表明溶液没有

充分中和。

7. $>4,000 \times g$ 离心 15 分钟。
若离心后上清液仍有杂质，请提高离心速度或重复离心一步。
8. 小心转移上清液至新的离心管中。**加入 1/3 倍体积 Buffer EP4(~2ml)至滤液中，颠倒混匀 10~15 次。室温静置 2 分钟。**
9. 将 MaxPure Midi Column 套在 15ml 收集管中。**转移 4ml 混合液至柱子中。**
 $3,000\sim 5,000 \times g$ 离心 3 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。**转移余下的混合液至柱子中。** $3,000\sim 5,000 \times g$ 离心 3 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子套回收集管中。**加入 4ml Buffer E5 至柱子。** $3,000\sim 5,000 \times g$ 离心 3 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管中。**加入 4ml Buffer PW2(已用无水乙醇稀释)至柱子。静置 2 分钟，** $3,000\sim 5,000 \times g$ 离心 10 分钟。
使用 Buffer PW2 之前，须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签所示。
13. 小心取出柱子，放置于 55°C 烘箱中干燥 10 分钟进一步去除乙醇。
14. 把柱子套在灭菌的 15ml 离心管中。**加入 0.4~1.5ml Buffer TE 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，** $13,000 \times g$ 离心 1 分钟。
若需高浓度的质粒 DNA，加入 $400\sim 700\mu\text{l}$ 灭菌水洗脱，这一步得到的质粒 DNA 可直接用于常规的细胞转染和动物注射，测序等。若下游运用对内毒素较为敏感时，可按方案 7 操作进一步去除内毒素。经方案 7 抽提后，质粒的内毒素含量可低至 $0.02\text{EU}/\mu\text{l}$ Plasmid。若需进行方案 7 操作时，这一步推荐用 1.5ml Buffer TE 洗脱两次，以提高质粒的产量。处理低拷贝数的载体，可能存在 RNA 污染，建议按方案 4 处理，可以去除 RNA 污染。

3. MaxPure Plasmid EF Maxi Kit 方案(P1222)

该方案适合于从 200~250ml 细菌培养液中提取 0.3~2.5mg 高拷贝数的质粒 DNA。

准备条件

- 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，把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 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，稀释后于室温保存。
- ◆ 水平式桶状离心机。(~4,000 × g)
- ◆ 灭菌的 50ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- ◆ LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

1. 将含目的质粒的菌种接种于含有 1 ml 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。

菌种保存过程存在质粒丢失现象，甘油保藏菌种须在固体平板上划线活化后，挑取单菌落进行小扩，不要用甘油保藏菌种进行小扩。培养瓶或培养管的体积必须大于或等于培养液体积的 5 倍。

2. 在 1L 培养瓶中加入 200~250ml 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 200~250ml 菌液。

4. **倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。加入 10ml Buffer E1/RNase A 至菌体中，高速涡旋重悬细菌，静置 10 分钟。**

彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。

5. **涡旋 5 秒重悬细菌，加入 10 ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。室温放置 3 分钟，其间颠倒混匀 3 次。**

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，总时间不要超过 4 分钟。

6. **加入 10 ml 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. 室温下, 3,000~5,000 × g 离心 5~10 分钟。
8. **取出过滤器(Clear Maxi Syringe)活塞, 把第七步的上清倒入过滤器中。**把过滤器的出水口对准已准备好的 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。
为了监控 DNA 得率, 取 0.3ml 上清液至新的离心管, 加入 90ul 异丙醇混匀, 转移至 DNA 结合柱(质粒小提试剂盒)进行过柱, 按小提试剂盒进行洗涤和洗脱, 计算出 DNA 的得率。

9. 测量滤液体积, **加入 1/3 倍体积 Buffer EP4(~9ml)至滤液中。**颠倒混匀 10~15 次, 室温静置 3 分钟。
这一步的温度必须控制在 15~30°C, 低于 15 度时, DNA 的得率会降低。不要涡旋混匀, 涡旋时产生大量的泡沫, 会降低 DNA 产量。

为方便操作, 第 10~13 步可选用美基抽滤盒进行抽滤操作。

10. **将 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**2,000 × g 离心 3 分钟。
11. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中, **把剩余的混合液转移至柱子中。**2,000 × g 离心 3 分钟。
12. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中, **加入 10ml Buffer E5 至柱子中。**3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
13. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管, **加入 15ml Buffer PW2 至柱子中, 静置 2 分钟, 轻轻摇晃离心管数次, 让 PW2 充分浸泡到膜中。**3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
14. 倒弃滤液, 把柱子套回 50ml 收集管中。**3,000~5,000 × g 离心 10 分钟。**取出吸附柱, 于 37~55°C 烘干 10 分钟。
15. 把柱子套在灭菌的 50ml 离心管中(自备)。**加入 1.5~3.0ml Buffer TE 至柱子膜中央。**静置 2 分钟。3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。弃去柱子, 把质粒保存于-20°C。若需高浓度的质粒 DNA, 加入 1.0~1.5ml 灭菌水洗脱, 这一步得到的质粒 DNA 可直接用于常规的细胞转染和动物注射, 测序等。若下游运用对内毒素较为敏感时, 可按方案 4 操作进一步去除内毒素。经方案 4 抽提后, 质粒的内毒素含量可低至 0.02EU/μl Plasmid。处理低拷贝数的载体, 可能存在 RNA 污染, 建议按方案 4 处理, 可以去除 RNA 污染。

4. 进一步抽提去除内毒素

试剂盒采用独特的溶液体系，可高效去除内毒素和 RNA 污染。从 MagPure Column 洗脱的质粒，其内毒素水平已经较低，可直接用于绝大多数的细胞转染和动物注射，但有些细胞株或动物对内毒素极为敏感，此时建议按以下步骤进一步去除内毒素。经方案处理后，质粒的内毒素含量可低至 0.02EU/ μg Plasmid。

1. 测量质粒的浓度，小量和中量提取时，用 Buffer E1/RNASE A 调整质粒至 0.1~0.3mg/ml。
2. **加入 0.1 倍体积 Buffer E3 和 0.1 倍体积 Buffer ER2 至质粒溶液中。**颠倒混匀 10~15 次。
举例：若质粒的体积为 1ml，则需加入 0.1ml Buffer E3 和 0.1ml Buffer ER2。此时溶液会出现浑浊的现象，但冰浴时溶液会变得澄清。
3. 冰上放置 20 分钟，其间颠倒混匀数次。
4. 42°C 水浴 5 分钟。室温下(20~30°C)，13,000 \times g 离心 3 分钟。
水浴后，溶液又会变成浑浊，离心后管底会形成一层红色的溶液。
5. 轻轻取出样品，不要打散底部的红色溶液。**小心把上清液转移至新的离心管中。加入 0.8 倍体积的异丙醇至上清液中。**颠倒混匀 20~30 次。
6. 室温下，13,000 \times g 离心 15 分钟。
7. 小心倒弃上清液。**加入等积样品体积的 75%乙醇至沉淀中。**涡旋混匀 15~30 秒。
8. 室温下，13,000 \times g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液。
9. 室温下，13,000 \times g 离心 1 分钟收集管壁上的液滴。
10. 小心吸弃所有的溶液(不要吸到沉淀)。空气干燥 5~10 分钟。
11. **加入适量的灭菌水或无内毒素水(自备)至质粒中。涡旋 10~20 秒混匀。**室温静置 10 分钟让质粒充分溶解，其间颠倒混匀数次。把质粒保存于-20°C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽全力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
产量低或无产量	
质粒拷贝数低；	提高菌液用量，按低拷贝数方案进行操作
培养条件有问题	检查培养条件，抗生素用量，甘油保藏的菌种一定要划平板活化
Buffer E2 有沉淀或失效	Buffer E2 在低温时可能会有沉淀析出，使用前需水浴使用溶解；Buffer E2 可能会被空气中 CO ₂ 中和而失效。
细菌没有彻底重悬	细菌沉淀团须在 Buffer E1/RNase A 混合液中充分重悬。
Buffer PW2 没有用乙醇稀释	Buffer PW2 在使用前须用无水乙醇进行稀释。收到试剂盒后，应尽快把乙醇加到 Buffer PW2 中，以防止微生物的污染。
洗脱体积太少	洗脱液必须加到柱子的膜的中央；增加洗脱次数或洗脱液的体积。
裂解或中和不充分	处理较多菌体时，溶液非常粘稠，加入 Buffer E2 或 Buffer E3 后，增加混匀次数，让细菌充分裂解和中和。
Buffer EP4 体积不准	测量上清液过滤体积，加入 1/3 倍的 Buffer B4，涡旋混匀。
RNA 污染	
Buffer E1 不含有 RNase A	使用前，没有把 RNase A 加到 Buffer E1 中。
Buffer E1/RNase A 混合液过期	Buffer E1/RNase A 混合液可于 4 度保存 6 个月。超过 6 个月后，可能需要再加入 RNase A。
下游实验结果不理想	
核酸酶污染	使用 endA+ 的菌株如 HB101 或野生型菌株，可能含有高丰度的核酸酶。加入 Buffer EP4 后(第 9 步)，再加入 Proteinase K (20mg/ml)至混匀液中，室温静置 15 分钟继续进行操作。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 5,000xg，离心时间为 15 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，12,000 x g 离心 2 分钟转移上清即可。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。