

HiPure Plasmid EF Mini Kit

低内毒素质粒小提中量试剂盒 (中高拷贝载体)

本产品为低内毒素高浓度的质粒 DNA 制备提供了一种快速且经济的解决方案。产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 10~20ml 细菌培养液中提取高浓度和高产量的质粒 DNA，纯化的质粒产量高达 200 μ g，内毒素含量 < 1EU/ μ g，浓度高达 3 μ g/ μ l，可直接用于细胞转染和动物注射等。30 分钟可以完成整个抽提过程，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。

产品组份

产品编号	P1112-01	P1112-02	P1112-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer E2	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer E3	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer E4	7 ml	33 ml	170 ml
Buffer E5	10 ml	40 ml	200 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	30 ml
HiPure EF Mini Column	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

版本号：2019-07

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 $^{\circ}$ C。低温下, Buffer P2 可能会有沉淀形成, 使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。当 RNase A 加入 Buffer E1 后, 可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。

准备事项

- 加入~0.5ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中，吸打 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，然后把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 中，于 2-8°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，于室温保存。
- 灭菌的 1.5ml 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°C 温浴溶解。

实验步骤(高拷贝数载体)

1. 将含质粒的菌种接种于含有 15~20ml LB/ 抗生素培养液的培养瓶中，37°C 摇床培养 14~16 小时扩增质粒。
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。
2. 3,000-5,000 × g 离心 10 分钟，收集 15~20ml 菌体。
3. **倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。加入 600µl Buffer E1/RNase A，高速涡旋充分重悬细菌。**
使用前，须把 RNase A 加到 Buffer E1 中。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。
4. **加入 600µl Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 6~8 次。**室温放置 2 分钟，其间颠倒混匀 2~3 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。
5. **加入 600µl Buffer E3 至裂解液中，立即颠倒 10~15 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。混匀过程须轻柔而充分。
6. 室温下，13,000 × g 离心 10 分钟。
7. **转移上清至 4~15ml 离心管中，加入 1/3 倍体积的 Buffer E4 (~550µl) 至上清中。**颠倒混匀 6~8 次。
低温下 Buffer E4 有沉淀析出，55°C 温浴 10~15 分钟使沉淀充分溶解后再使用。
8. **将 HiPure EF Mini Column 套在收集管中。转移 750µl 混合液至柱子中。**10,000 × g 离心 15~60 秒。

9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，继续转移剩余的混合液至柱子中。10,000 × g 离心 15~60 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 650μl Buffer E5 至柱子中。10,000 × g 离心 15~60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 650μl Buffer PW2(已加无水乙醇稀释)至柱子中。静置 2 分钟，10,000 × g 离心 15~60 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 650μl Buffer PW2(已加无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 15~60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。
14. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30~100μl Buffer TE 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟洗脱 DNA。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

附加方案(低拷贝数载体，处理质粒产量低于 2ug/ml 菌液的载体)

1. 按高拷贝的第 1~6 步进行操作准备上清液。
2. 转移上清至 4~15ml 离心管中，加入 0.3 倍体积的异丙醇至滤液中，颠倒混匀 6-8 次。
3. 将 HiPure EF Mini Column 套在收集管中。转移 750μl 混合液至柱子中。10,000 × g 离心 15~60 秒。
4. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，继续转移剩余的混合液至柱子中。10,000 × g 离心 15~60 秒；重复此步直至所有混合液都转移至柱子中离心过滤。
5. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 650μl Buffer PW2(已加无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 15~60 秒。
6. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。
7. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30~100μl Buffer TE 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟洗脱 DNA。
8. 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 4~16 μ 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 μ 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。
- **低温离心:** 加入 Buffer E4 后, 不能低温放置或低温离心。
- **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 加入量为常规产品的 2 倍, 使用时 Buffer E1/RNase 不要与其产品交互使用。Buffer E1/RNase 保存时间不要超过 6 个月。
- **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 16 小时, 以降低菌液中 RNA 的丰度。
- **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。简易沉淀流程: 加入 0.1 倍体积 3M 醋酸钠(pH5.5)和 0.7 倍体积的异丙醇至质粒溶液中, 混匀后高速离心沉淀收集 DNA, 用 70%乙醇洗涤除盐, 空气干燥加入灭菌水溶解。详细可参照分子克隆等。

若以上的解答还是无法解决您的问题, 请您联系我们。