HiPure Plasmid EF Mega Kit

去内毒素质粒超大量提取试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 0.5L 细菌培养液中提取高浓度和高产量的低内毒素质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 5mg，内毒素含量<1EU/μg，浓度高达 2μg/μl，可直接用于细胞转染和动物注射等。70 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.	P1116-01	P1116-02	P1116-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	60 mg	2 x 120 mg
Buffer E1	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E2	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E3	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E4	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E5	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer PW2*	20 ml	100 ml	4 x 100 ml
Buffer TE	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer SDS	3 ml	15 ml	60 ml
Blue Plus	0.5 ml	1 ml	5 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure EF Maxi Column	2	10	50
50 ml Collection Tube	2	10	50

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。

实 验 步 骤

- 加入 0.2~0.5ml Buffer E1 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 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 瓶子中于室温保存。
- 灭菌的 50ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养瓶

1. 将含质粒的菌种接种于含有 1 ml LB/抗生素培养液的培养管中，37℃摇床培养 8 小时小量扩增菌种。

2. 在 2-3L 培养瓶中加入 0.5L 含抗生素 LB 培养液；接种 1/1000 初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养 16 小时。

   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. 4,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 500mL 菌液。

4. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。**加入 20ml Buffer E1/RNase A 至菌体中**，高速涡旋重悬细菌。

5. **加入 20ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。**室温放置 3~5 分钟，其间颠倒混匀 3~5 次。

6. **加入 20ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~30 次或直至样品充分混匀。**室温下，4,000~5,000 x g 离心 10 分钟。

7. 取一个新的 Clear Maxi Syringe，取出过滤器的活塞。转移上清液(第 6 步)至针筒中。插入活塞把溶液过滤到合适的容器中。

8. 测量滤液体积，**加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液。**颠倒 6~8 次。

9. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把 MaxPure EF Maxi Column 插到真空抽滤盒的接口处。**倒入 20ml 混合液(第 8 步)柱子中。打开真空泵进行抽滤，及时倒入混合液(不要抽干)至柱子中抽滤，直到所有的混合液都从柱子过滤完毕，**关闭真空泵。选择高纯质粒流程或无内毒素质粒流程进行操作。

   抽滤时，混合液吸干后会产生大量气泡堵塞滤膜造成抽滤速度变慢。及时倒入混合液，不要让其吸干可以提高过滤速度。若无抽滤系统，第 9-10 步可以用离心方法操作代替。把 MaxPure EF Maxi Column 装在 50ml 离心管中，转移最多不超过 20ml 混合液或洗涤液至柱子中，于 2,000~3,000 x g 离心 3 分钟。

高纯质粒（快速流程）

10. **加入 10ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当溶液完全抽滤后，加入 2 x 15ml Buffer PW2 至柱子进行抽滤。**过滤完毕后，关闭真空泵。

11. 取下柱子，装到 50ml 离心管中，4,000~5,000 x g 离心 10 分钟。取出柱子，于 50~55℃ 烘干 10 分钟进一步干燥柱子。

12. 把柱子套在 50ml 离心管中(自备)。**加入~1.5ml Buffer TE 至柱子膜中央，**静置 3 分钟。4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。

13. **加入~1.5ml Buffer TE 至柱子膜中央，**4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。

14. 弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

低内毒素质粒（<0.1EU/ug）和低拷贝数流程

10. **加入 2 x 15 ml Buffer PW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤。**当溶液过滤完毕后，继续抽滤 10 分钟干燥柱子，关闭真空泵。

11. 取下柱子，装到 50ml 离心管中，**加入 2ml Buffer E1 和 8ml 灭菌水至柱子中，静置 3 分钟。**4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。取出柱子装在另一个干净的 50ml 离心管中（待用）。

12. **加入 1.0ml Buffer SDS 至滤液，涡旋混匀 10 秒，静置 5 分钟，其间混匀 2 次。**

13. **加入 2.0ml Buffer E3 至混合液中，涡旋混匀 10 秒。**把全部混合液转移至柱子中（第 11 步），4,000~5,000 x g 离心 3 分钟。

14. 弃去柱子，把滤液转移至高速离心管（自配），加入 10ml 异丙醇至滤液中，颠倒混匀 10-15 次，静置 10 分钟。4℃, 10,000~15,000 x g 离心 20 分钟，小心倒弃上清液。

15. 加入 5ml 75%乙醇至沉淀中，涡旋 15 秒。10,000~15,000 x g 离心 10 分钟，倒弃上清液。

16. 空气干燥 10~15 分钟。

17. 加入 0.5~1.5ml Buffer TE 或注射用水，涡旋混匀 10 秒。室温放置 5 分钟让质粒充分溶解，转移至 1.5ml 离心管中保存。

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 E4 后，不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误**: Buffer E4 不能低温放置，Buffer E2/E4 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 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。
- **低拷贝数和长片段载体**：本产品对低拷贝数和长片段的载体(>8KB)抽提效率较低，建议使用 magen 公司的 HiPure Plasmid/BAC EF Kits 进行抽提。
- **角度离心**: 由于 HiPure EF Maxi Column 柱子的内径较大，最好的桶状离心机。若无桶状离心机，可以真空抽滤过柱。
- **洗脱不充分**：再加入 0.4ml Buffer TE 至柱子膜中央进行第三次洗脱。

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。