

HiPure Plasmid EF Giga Kit

去内毒素质粒宏量提取试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 1L 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 10mg，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.	P1117-01	P1117-02
包装次数	2 次	10 次
RNase A	10 mg	60 mg
Buffer E1	100 ml	500 ml
Buffer E2	100 ml	500 ml
Buffer E3	100 ml	500 ml
Buffer E4	100 ml	500 ml
Buffer E5	110 ml	550 ml
Buffer PW2*	50 ml	3 x 100 ml
Buffer TE	30 ml	200 ml
MaxPure Giga Column	2	10
Clear Maxi Syringe	2	10

版本号：2019-01

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。

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 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 5L 培养瓶中加入 1L 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 12~16 小时。

3. 4,000~5,000 × g 离心 15 分钟，收集 1L 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 45ml Buffer E1/RNase A 至菌体中**，高速涡旋重悬细菌。

RNase A 可以预先加入 Buffer E1 中，该混合液可在 2-8℃ 保存 6 个月。

5. **涡旋 5 秒，加入 45 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 3~5 次。

6. **加入 45ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~30 次或直至样品充分混匀。**4,000~5,000 × g 离心 15 分钟。

7. 取一个新的 Clear Maxi Syringe，小心取出过滤器的活塞。转移一半体积的上清液(第 6 步)至针筒中。插入活塞把溶液过滤到合适的容器中。过滤完毕后，缓慢取出过滤器的活塞。把剩余的上清液转移至针筒中。再插入活塞把溶液过滤到容器中。

为了监控 DNA 的得率，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)进行离心过柱，按小提试剂盒进行洗涤和洗脱，计算出 DNA 的得率。

8. 测量滤液的体积，**加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液中。**颠倒混匀 10~15 次，静置 3 分钟。

这一步的温度必须控制在 15~30℃，低于 15 度时，DNA 的得率会降低。

9. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把 MaxPure Giga Column 插到真空抽滤盒的接口处。

10. **倒入 60ml 混合液(第 8 步)至柱子中。打开真空泵进行抽滤，继续倒入混合液至柱子中抽滤，直到所有的混合液都从柱子过滤完毕，关闭真空泵。**

抽滤时，不要等到溶液抽干后再加入液体，最好余下 2-3ml 时，就加入液体，以防上产生大量的泡沫，减少抽滤速度。

11. **加入 50ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，抽滤完毕后不要关闭真空泵。**

Buffer E5 必须彻底抽滤完全后，才能加入 Buffer PW2。

12. **加入 40ml Buffer PW2 至柱子中，当溶液过滤完毕后，加入 40ml Buffer PW2 至柱子中。当溶液过滤完毕后，再加入 40ml 无水乙醇至柱子中。**

使用前 Buffer PW2，必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签或说明书所示。

13. **当溶液过滤完毕后，不要关闭真空泵，再抽滤 15 分钟以干燥柱子，去除残留的乙醇。取下柱子于 55℃烘箱中干燥 15 分钟。**

14. **取下 MaxPure Giga Column 放入合适的架子上，加入 6~15ml 灭菌水至柱子中。静置 3 分钟。小心把活塞插入到柱子中，缓慢推动活塞把质粒溶液过滤至 50ml 离心管中。**

15. **缓慢取出活塞，再加入 6~15ml 灭菌水至柱子，静置 3 分钟。小心把活塞插入到柱子中。缓慢推动活塞把质粒溶液过滤至 50ml 离心管中。**

进一步抽提去除内毒素

1. **转移 DNA 至新的离心管中。加入 0.1 倍体积的 3M NaAc,pH5.2 和 0.8 倍体积的异丙醇至上清液中，颠倒混匀 15~30 次。**
2. **室温下，10,000 x g 离心 10 分钟。**
3. **小心倒弃上清液。加入 2~5ml 70%乙醇至沉淀中。涡旋混匀 15~30 秒。10,000 x g 离心 3 分钟。小心倒弃上清液。**
4. **短暂离心，10,000 x g 离心 1 分钟。小心吸弃所有的溶液，干燥 10 分钟。**
5. **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。**
6. **室温静置 10~30 分钟让质粒充分溶解，其间颠倒混匀数次。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。
- **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 PVW2 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。