MaxPure Plasmid EF HC Kit

低拷贝质粒小提大量试剂盒

本产品适合于从 20~50ml 细菌培养液中提取高浓度的低内毒素质粒 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	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer LEN3	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer LN4	15 ml	60 ml	350 ml
Buffer PW2*	6 ml	6 ml	20 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
Sealing Ring	2	10	50

版本号：2020-12-23

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。
- 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 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 20ml。

实 验 步 骤

1. 将中高拷贝数质粒的菌种接种于含有 20ml LB/抗生素培养液的培养管中，或将含低拷贝数质粒的菌种 50ml LB/抗生素培养液的培养瓶中，37℃摇床培养 16 小时扩增质粒。

2. 4,000-5,000 × g 离心 10 分钟，收集 20~50ml 菌体。

   HiPure DNA Mini Column III 最大吸附力为 100μg，处理中高拷贝载体时，菌液用量不要超过 30ml。处理低拷贝载体，菌液用量可最高达到 75ml，处理 50-75ml 菌液时，建议按比例扩大 P1,P2,LEN3 的用量，以充分让细菌裂解。

3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**加入 2.6ml Buffer P1/RNase A，**高速涡旋充分重悬细菌。

   使用前须把 RNase A 加到 Buffer P1 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 2.6ml Buffer P2，颠倒混匀 8~10 次，室温放置 3 分钟，其间颠倒混匀 3~5 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。如有必要，室温放置 2 分钟，其间颠倒混匀几次。处理多个样品时，总操作时间不要超过 4 分钟。

5. **加入 1.3ml Buffer LEN3，立即颠倒 10~15 次。**

   加入 Buffer LEN3 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，>4,000 x g 离心 15 分钟。

7. 小心转移上清液至新的离心管中，**加入等倍体积 Buffer LN4，**颠倒混匀 6~8 次。

   若上清有沉淀转移，再进行离心进一步去除杂质后，才加入 Buffer LN4.

8. 取出 HiPure DNA Mini Column III，用力把 Extender Tube(延长管)插到吸附柱中，把 Sealing Ring(密封圈)套在柱子的中部，放到 Support Tube(支撑管)管子中，最后再一起装到 50ml 离心管中。

9. **把第 7 步获得的混合液全部至 HiPure DNA Mini Column III Set 中，盖上盖子。**2,000 x g 离心 3~5 分钟。

   混合液体积超过 14ml 时，分二次加入。

10. 丢去延长管、底部的支撑管、50ml 离心管和密封圈，只保留吸附柱。

11. 把 HiPure DNA Mini Column III 装在 2ml 收集管中。**加入 650μl Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，**13,000 x g 离心 1 分钟。

12. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。**加入 650μl Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，**13,000 x g 离心 1 分钟。

13. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。13,000 x g 离心 3 分钟甩干柱子。

14. **把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中(自备)。加入 50~100μl 灭菌水至柱子膜中央。**静置 3 分钟。13,000 x g 离心 1 分钟。

15. **再把洗脱液转移至柱子膜中央。**静置 3 分钟。13,000 x g 离心 1 分钟。

16. 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。
- **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。