

HiPure Plasmid EF Midi Kit

去内毒素质粒中提试剂盒（通用型）

本产品适合于从 30~50ml 细菌培养液中提取 50~250 μ g 低内毒素的质粒 DNA。产品采用独特的溶液体系，可处理各种质粒载体，包括常规高低中拷贝数的载体、大型载体，如 BAC, Cosmid, P1 等。DNA 产量取决于载体拷贝数和菌液量。纯化的质粒内毒素含量低于 0.5EU/ μ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

产品组份

产品编号	P1155-01	P1155-02	P1155-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	20 mg	60 mg
Blue Plus	200 μ l	200 μ l	1.0 ml
Buffer ER2	1.8 ml	10 ml	50 ml
Buffer P1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer LN3	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer PW1	6 ml	15 ml	60 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
HiPure DNA Midi Column III	2	10	50
15 ml Collection Tube	2	10	50

版本号：2023-01

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 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。

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°C 保存，有效期为 6 个月。
- (可选)Blue Plus 特殊的颜色反应，有利于监控碱裂解过程。Blue Plus 可预先添加到 Buffer P1 中。由于 Blue Plus 不溶解于 Buffer P1 中，添加 Blue Plus 后，Buffer P1 会产生少量沉淀，使用前要摇匀。按 1ml Buffer P1 加入 4ul Lyse Blue。
- 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。

实验步骤

1. 将含目的质粒的 E. coli 接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37°C 摇床培养 6~8 小时扩增菌液。在 0.2L 三角瓶中加入 30~50ml 含抗生素 LB 培养液，接种 0.1% 初级菌液至培养瓶中，37°C 摇床培养 16 小时。
处理低拷贝载体时，菌液用量可以加至 50-75ml。第 2-5 步处理时，无需加倍试剂用量。
2. 4,000~5,000 x g 离心 10 分钟，收集 30~50ml 菌液。
3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 2.5 ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋重悬细菌。
彻底重悬细菌对产量很关键，充分重悬后应看不到细菌团块。Blue Plus 可以预先加入 Buffer P1/RNase A，以起到监控裂解的作用。按每 ml Buffer P1 加入 4ul Lyse Blue。
4. 加入 2.5 ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 10~15 次。室温静置 3 分钟，其间颠倒混匀 3~5 次。
颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。
5. 加入 1.3 ml Buffer LN3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀。
加入 Buffer LN3 后，应立即颠倒混匀。充分混匀后，产生的絮状沉淀最终是均一白色的。
6. 4,000~5,000 x g 离心 10 分钟。
7. 取出过滤器活塞，把第 6 步上清倒入过滤器中。把过滤器的出水口对准已准备好的 15ml 离心管(自备)。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 15ml 离心管中。
8. 加入 0.1 倍体积 Buffer ER2 至滤液中，混匀，冰上放置 15 分钟，其间颠倒混匀数次。按

简易方案 A 操作或高敏方案 B 进行操作。

- **简易方案 A:** 加入 0.5 倍体积无水乙醇至混合液中，颠倒混匀 8~10 次，按第 9 步操作。无水乙醇体积=0.5 × (滤液体积+Buffer ER2 的体积)。

- **高敏方案 B:**

[B1] 第 8 步的混合液于 50°C 水浴 5 分钟。 室温下，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

[B2] 从离心机中轻轻取出样品，把上清液转移至新离心管中。

50°C 水浴后，Buffer ER2 与内毒素结合在一起形成液泡结构，在离心后在离心管底部分层成红色溶液层。若离心后若没有形成分层，再颠倒混匀 5-6 次，重复 B1 步的操作，并确保离心机处于室温或已完全恢复室温。若离心后有大量液滴状的 ER2 有不能完全沉淀到管底，重复离心步骤，并调整离心机参数至缓慢降速状态。取出离心管时，轻轻取出。Buffer ER2 与内毒素分子形成的液滴密度只稍高于上清液，很容易受外力因素影响分层。有少量液滴悬浮在上清液中，静置 3-5 分钟后使之沉淀后再转移上清液。转移少量的 ER2 液滴不影响 DNA 产量。

[B3] 加入 0.3 倍体积异丙醇至上清液中，颠倒混匀 6~8 次，按第 9 步操作。

9. 将 HiPure DNA Midi Column III 套在 15 ml 收集管中，转移一半体积的混合液[第 8 步]至柱子中。4,000~5,000 × g 离心 2 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。转移余下的混合液[第 8 步]至柱子并离心。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 1ml Buffer PW1 至柱子中。4,000~5,000 × g 离心 2 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 4ml Buffer PW2 至柱子中。4,000~5,000 × g 离心 2 分钟。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。
14. 取出吸附柱，室温放置 10~15 分钟晾干吸附膜。
15. 把柱子套在另一个灭菌的 15ml 离心管中(自备)。加入 0.5ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。静置 2 分钟，4,000~5,000 × g 离心 2 分钟。
16. 再加入 0.3ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。静置 2 分钟，4,000~5,000 × g 离心 2 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20°C。

质粒浓缩 (进一步去除内毒素和 RNA 污染)

1. 取第 16 步的洗脱液至 1.5ml 离心管中，然后加入 0.1 倍的 Buffer LN3，颠倒混匀。
2. 加入 0.8 倍异丙醇，颠倒混匀 10-15 次。室温静置 5min，13,000rpm 离心 10min。
3. 弃上清，加入 1.0ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm 离心 5min。
4. 弃上清。再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 3~5min。
5. 加入适量的 Elution Buffer 或灭菌水至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。

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 3~12 μ g)。长片段质粒(>7KB)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，养菌前最好划线活化以稳定产量。
- **异丙醇的体积:** 异丙醇加入量是上清液体积的 0.33 倍。

2. RNA 污染

- **RNase A 保质期:** Buffer P1/RNase A 保存时间不要超过 6 个月。

3. ER2 不分层或分层效果不佳

- **不分层:** 42°C~50°C 才能让 ER2/内毒素形成不溶解的液泡结构，离心时必须在室温 (>15°C) 下进行，低温离心会导致 ER2 重新溶解。
- **分层效果不佳:** 由于 ER2 的密度只比水密度稍大一些，从离心机取出必须缓慢，以免 ER2 重新悬浮到溶液中。静置 10 分钟后，让 ER2 沉淀到管底后，转移上清液。转移时，吸到少量的 ER2 不影响产量。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。