

HiPure Plasmid EF Maxi Kit

去内毒素质粒大提试剂盒（通用型）

本产品适合于从 100~250ml 细菌培养液中提取 100~1500 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 0.1EU/ μ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

产品组份

产品编号	P1156-01	P1156-02	P1156-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	40 mg	160 mg
Buffer P1	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer P2	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer LN3	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW1	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW2*	6 ml	50 ml	2 x 100 ml
Elution Buffer	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer CL (平衡液 CL)	6 ml	30 ml	150 ml
Blue Plus	500 μ l	1 ml	3 ml
Buffer ER2	6 ml	30 ml	180 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
HiPure DNA Maxi Column C	2	10	50
50ml Collection Tube C	4	20	100

版本：202401

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 P1 后，可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。

准备事项

- 加入~0.5ml Buffer P1 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 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 Blue Plus。
- 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. 将单克隆菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37°C 摇床培养 6~8 h 小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 1ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C 摇床(200-300rpm)培养 6-8 小时。甘油保存菌种在保存过程可能会丢失载体，先划平板进行活化，用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。

2. 在 1~1.5L 培养瓶中加入 100~250ml 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 12~14 小时。

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。2 × YT 或 TB 培养液中菌体生长速度过快，不利于质粒充分复制，应尽量避免使用。使用 YT 或 TB 培养液时，按细菌生物量进行转换。高拷贝生物量为 450，低拷贝生物量 900。若 YT/TB 培养液培养后，OD600=10，则高拷贝菌液量为 45ml，低拷贝菌液用量 90ml。纯化大柱最大结合力为 1500µg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 8,000rpm 离心 3 分钟，收集◆100~150ml 或●200~250ml 菌液。

4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入◆6ml 或●10ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

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。

5. 加入◆6ml 或●10ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 8~15 次。室温静置 3~5 分钟，其间颠倒混匀数次直至完全裂解。

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。当菌液用量达 150ml/250ml 时，裂解液会极为粘稠，属于高密度碱裂解类型，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让菌体充分裂解，总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 加入◆3ml 或●5ml Buffer LN3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状的悬浊液。8,000rpm 离心 10 分钟。

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。当菌

液用量达 150ml/250ml 时，属于高密度碱裂解类型，中和时会形成大块且紧密的沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍振荡让大块沉淀团分散成较小的团块，让 Buffer LN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. **取出过滤器的活塞，把第 7 步的上清全部倒入过滤器中。**把过滤器的出水口对准离心管或合适大小的瓶子（自备）。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到合适容器中。
8. **加入 0.1 倍体积 Buffer ER2 至滤液中，颠倒 10-15 次。**
9. **按简易方案 A 操作或高敏方案 B 进行操作。**
 - **简易方案：**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 10 步操作。
无水乙醇体积=0.5 × (滤液体积+Buffer ER2 的体积)。
 - **高敏方案：**冰上（或冰箱 2-8℃）放置 10~15 分钟，其间颠倒混匀数次，42-50℃ 温育 3-5 分钟形成悬浊液。室温下（15~25℃），8,000 rpm 离心 10 分钟。从离心机中轻轻取出样品，把上清液转移至新离心管中。加入 0.33 倍体积异丙醇至上清液中，颠倒混匀 6~8 次，按第 10 步操作。
离心后管底有红色液层。若离心后没有分层，颠倒混匀 5-6 次再离心，并确保离心机已完全恢复至室温。离心后液滴状 ER2 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。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。
10. **(平衡柱子)将 HiPure DNA Maxi Column C 套在 50 ml 收集管中，转移 2.5 ml Buffer CL (平衡液)至柱子中，静置 2 分钟。8,000 rpm 离心 3 分钟。**
11. **倒弃滤液，把柱子套回收集管。转移 10~15ml 混合液(第 9 步)至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**

纯化柱的最大容积为 15ml，需要分 2~3 次过柱。若离心机转子倾角较大，建议加入不超过 14 ml，以防产生漏液现象。受离心机角度影响，以及大量试剂反复过柱，柱子中表层滤膜会有少量脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。
12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。重复第 11 步至混合液都转移至柱子并离心。**
13. **倒弃滤液，把柱子套回收集管。加入 5ml Buffer PW1 至柱子，8,000rpm 离心 3 分钟。**

Buffer PW1 清洗会洗掉超过的质粒 DNA，会降低产量，所以处理高拷贝载体，省略这一步操作。处理低拷贝载体时，建议不要省略这一次。Buffer PW1 可以洗掉 RNA 污染，测量 OD260 时，DNA 的浓度更为真实。
14. **倒弃滤液，把柱子套回收集管。加入 9ml Buffer PW2 至柱子中，8,000rpm 离心 10 分钟。**

为确保彻底去除乙醇，建议取出吸附柱，打开盖子，室温或 55 度干燥 10~15 分钟。

倒弃收集管中的滤液，并在吸水纸拍打让滤液完全流尽，室温放置晾干离心管中。滤液含 80% 乙醇可以起用浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，收集管可以用于第 15 步的质粒 DNA 收集。

15. 把柱子套在收集管 C 中，加入 0.7~1.5ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 3 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20℃ 保存。
 - 为了增加质粒的回收效率，建议将得到的质粒溶液重新加入吸附柱中，进行第二次洗脱。由于滤膜存在吸水性，会有~0.15ml 洗脱液损失，洗脱体积不建议低于 0.7ml。
 - 这一步得到的质粒 DNA 可以直接用于细胞转染。由于 Elution Buffer 不含防腐剂，建议用新配制的灭菌水代替，以防止微生物感染。质粒 DNA 用于用于动物注射或敏感细胞转染，建议用附加流程用 Buffer ER2 (Triton X-114) 抽提进一步降低内毒素水平，然后再用于动物注射和高敏转染。
 - 低拷贝载体或富含 RNA 菌种，质粒 DNA 可能会含有短片段 RNA，会造成 OD260 吸光值很高，质粒 OD 浓度与电泳亮度不符合。用电泳校准核酸浓度后再使用或用附加流程进一步纯化去除短片段 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。

附加流程：进一步纯化质粒 DNA (注射级)

1. 取质粒 DNA (第 15 步) 至 2.0ml 离心管中，加入 0.1 倍 Buffer LN3，颠倒混匀。

为方便计算，若洗脱液不足 0.9ml，加入 Elution Buffer 补足至 0.9ml，然后加入 0.1ml Buffer LN3。若洗脱液体积超过 0.9ml，加入 Elution Buffer 补足至 1.8ml，混匀后分装至两个 2.0ml 离心管中，每管 0.9ml，然后每管再加入 0.1ml Buffer LN3。
2. 加入 0.1 倍体积的 Buffer ER2，颠倒混匀数次，冰上 (或 2-8℃ 冰箱) 放置 10 分钟，其间颠倒数次。室温下，13,000rpm 离心 10min，转移上清液至新的离心管中。

离心后管底分层成红色液层。若离心后没有形成分层，再颠倒 5-6 次，重复离心步骤，并确保离心机已完全恢复至室温。若质粒用于动物注射或高敏应用，建议重复第 2 步两次以达到无内毒素级。
3. 加入 0.7 倍体积(上清液体积)的异丙醇，颠倒混匀 10-15 次。室温静置 5min，13,000rpm 离心 15min。

离心后，DNA 沉淀物有可能看不到，特别是处理中低拷贝数载体时，DNA 产量太少形成的沉淀更不可见。受离心机角度影响，部分 DNA 沉淀可能粘附的管壁上。若 DNA 沉淀粘附不紧，离心后取出离心管后再颠倒数次让沉淀从管壁上脱落，再重复离心步骤。
4. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 rpm 离心 3min。小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5min。
5. 加入适量灭菌水至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。