

HiPure Plasmid EF Mini Kit

低内质粒小中提试剂盒

本产品为低内毒素高浓度的质粒 DNA 制备提供了一种快速且经济的解决方案。产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 10~20ml 细菌培养液中提取高浓度和高产量的质粒 DNA，纯化的质粒产量高达 200 μ g，内毒素含量 < 1EU/ μ g，浓度高达 3 μ g/ μ l，可直接用于细胞转染等。30 分钟可以完成整个抽提过程，操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。

产品组份

产品编号	P1112-01	P1112-02	P1112-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer E2	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer E3	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer E4	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer E5	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer EVB	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer PW2*	10 ml	20 ml	50 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	30 ml
HiPure EF Mini Column	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

版本号：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 E2/E4 可能会有沉淀形成，使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。

准备事项

- 加入~0.5ml Buffer E1 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 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，于室温保存。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

实验步骤 A (高拷贝数载体)

1. 将含质粒的菌种接种于含有 15~20ml LB/抗生素培养液的培养瓶中，37℃ 摇床培养 14 小时扩增质粒。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 10~20ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37℃ 摇床(200-300rpm)培养 12-14 小时。培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。平板挑菌培养时，可能会存在一些菌株生长缓慢，培养过夜后可通过菌液密度或 OD600 来判断。培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。不要用 TB 或 2 × 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。

2. 3,000-5,000 × g 离心 10 分钟，收集 15~20ml 菌体。倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。
3. 加入 600μl Buffer E1/RNase A，高速涡旋充分重悬细菌。

使用前，须把 RNase A 加到 Buffer E1 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 600μl Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 10~15 次。室温放置 1 分钟，其间颠倒混匀数次。

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。当菌液用量达 20ml 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，并轻稍振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过 3 分钟。

5. 加入 600μl Buffer E3 至裂解液，立即颠倒 10~15 次，转移全部中和液至 2.0ml 离心管中。加入 Buffer E3 后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量达 20ml

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，并轻稍振荡让大块沉淀团分散成较少的团块，让 Buffer E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

6. 室温下， $13,000 \times g$ 离心 10 分钟。
7. 转移上清液至合适的离心管，加入 1/3 倍体积的 Buffer E4 (~550 μ l)，颠倒混匀 6~8 次。
8. 将 HiPure EF Mini Column 套在收集管中。转移 750 μ l 混合液至柱子中。 $13,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，继续转移剩余混合液至柱子。 $13,000 \times g$ 离心 30~60 秒，重复此步直至所有混合液都转移至柱子中离心过滤。
10. 倒弃滤液把柱子套回收集管中。加入 600 μ l Buffer E5 至柱子。 $13,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
11. (可选) 倒弃滤液把柱子套回收集管。加入 600 μ l Buffer EWB 至柱子。 $13,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管。加入 600 μ l Buffer PW2 至柱子。 $13,000 \times g$ 离心 30~60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。 $13,000 \times g$ 离心 2 分钟。
14. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l Buffer TE 或灭菌水至膜中央，静置 2 分钟， $13,000 \times g$ 离心 1 分钟洗脱 DNA。弃去柱子，把质粒保存于 -20°C 。
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。建议电泳后校准核酸浓度后再使用或用附加流程进一步纯化让质粒 OD 浓度更为准确。由于 Buffer TE 不含防腐剂，建议用新配制的灭菌水或重新灭菌后使用，以防止微生物感染。

实验步骤 B (中低拷贝数载体)

本方案采用异丙醇介导结合，能有效去除 RNA 污染，更适合于处理中低拷贝数载体，处理 1ml 培养过夜的 LB 培养菌液中，质粒产量低于 3 μ g 的载体。

1. 按实验步骤 A 的第 1~6 步进行操作准备上清液。
2. 转移上清液至合适的离心管中，加入 0.3 倍体积的异丙醇，颠倒混匀 6-8 次。

3. 将 HiPure EF Mini Column 套在收集管中。转移 750 μ l 混合液至柱子中。13,000 \times g 离心 30~60 秒。
4. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中,继续转移剩余的混合液至柱子中。13,000 \times g 离心 30~60 秒;重复此步直至所有混合液都转移至柱子中离心过滤。
5. 倒弃滤液把柱子套回收集管。加入 600 μ l Buffer EWB 至柱子。13,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液把柱子套回收集管。加入 600 μ l Buffer PW2 至柱子。13,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. 倒弃滤液把柱子套回收集管。加入 300 μ l Buffer PW2 至柱子。13,000 \times g 离心 30~60 秒。取出柱子时不要颠倒或侧转,不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体,倒弃废液后,把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
8. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。
9. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中,加入 30~50 μ l Buffer TE 或灭菌水至柱子的膜中央。静置 2 分钟,13,000 \times g 离心 1 分钟洗脱 DNA。
由于 Buffer TE 不含防腐剂,建议用新配制的灭菌水或重新灭菌后使用,以防止微生物感染。
10. 弃去柱子,把质粒保存于-20 $^{\circ}$ C。

附加流程:进一步纯化质粒 DNA

1. 取质粒 DNA,用 Buffer TE 或灭菌水补足 0.45ml,加入 50 μ l Buffer E3,混匀。
2. 加入 350 μ l 异丙醇至样品中,涡旋混匀 10 秒。13,000 \times g 离心 10 分钟。
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。
3. 小心倒弃上清液,加入 0.5ml 75%乙醇,涡旋 5 秒,13,000 \times g 离心 3 分钟。
4. 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,涡旋混匀,放置 5-10min,其间混匀数次,让质粒充分溶解。