

## HiPure Plasmid EF Midi Kit

低内质粒中提试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 30~100ml 细菌培养液中提取高浓度和高产量的转染级质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 1mg，内毒素含量 < 1EU/ $\mu$ g，浓度高达 1 $\mu$ g/ $\mu$ l，可直接用于细胞转染和部分动物注射。40 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

产品编号	P1113-01	P1113-02	P1113-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer E2	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer E3	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer E4	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer E5	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer EVB	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PW2*	3 ml	20 ml	50 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	60 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
HiPure EF Midi Column	2	10	50
15 ml Collection Tubes	2	10	50

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℃。低温下保存，Buffer E2/E4 会有沉淀形成，55℃ 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，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 中，于 2-8°C 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

1. 将单克隆菌斑接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5~10ml 培养管中，37°C 摇床培养 6~8 小时进行小量扩增菌液。

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◆200ml 培养瓶加入 30~50ml LB/抗生素培养液；或在■500ml 培养瓶中加入 75~100ml LB/抗生素培养液，接种 0.001 倍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。本产品不要用 TB 或 2 x 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。纯化中柱最大结合力为 1000µg，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。

3. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集◆30-50ml 或■75-100ml 菌液。倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入◆2.5ml 或■5ml Buffer E1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显的菌块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。

5. 加入◆2.5ml 或■5ml Buffer E2 至重悬液，温和地上下颠倒并转动离心管 6~8 次，室温静置 2 分钟，其间颠倒混匀数次直至形成透光无团块的裂解液。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的溶液而且透亮。涡旋会造成基因组

污染。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。当菌液用量达 50ml/100ml 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 5 分钟。

6. 加入◆2.5ml 或■5ml Buffer E3 至裂解液，立即稍快速上下颠倒 10~15 次或直至形成蛋花状的悬浊液，3,000~5,000rpm 离心 10 分钟。

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 50ml/100ml 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。

7. 取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第 6 步的上清液倒入过滤器中，把活塞插入过滤器，推动活塞使裂解液过滤到合适的离心管或瓶子中。

8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液中，颠倒混匀 6-8 次。

9. 将 HiPure EF Midi Column 套在 15ml 收集管中，转移 4ml 混合液至柱子中。3,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，把剩余混合液转移至柱子。3,000~5,000rpm 离心 3 分钟。重复此步直至所有混合液都转移至柱子中离心过滤。

处理 75~100ml 菌液时，这一步需要重复 3-4 次才能把全部混合液过滤完毕。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 4ml Buffer E5 至柱子。3,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

12. (可选)倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 4ml Buffer EVB 至柱子。3,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

13. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 4ml Buffer PW2 至柱子。3,000~5,000rpm 离心 10 分钟。

14. 取出 HiPure EF Midi Column，室温放置 10 分钟晾干柱子滤膜。倒弃收集管中的废液，并在吸水纸拍打吸弃液体后，晾干备用。

Buffer PW2 含 80%乙醇可以起用浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，离心管中可以用于第 15 步的质粒 DNA 收集。

15. 把柱子套在 15ml 收集管中，加入 0.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央。静置 2 分钟，

3,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

16. 加入 0.3~0.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央，静置 2 分钟，3,000~5,000rpm 离心 3 分钟。弃去柱子，转移质粒至 1.5-2.0ml 离心管中，把质粒保存于-20℃。

由于滤膜存在吸水性且离心速度转低，约有 0.2ml 洗脱液损失，进行第二次洗脱能有效洗脱出余下的质粒 DNA。处理低拷贝载体，建议第一次加入 0.4ml 洗脱液离心，第二次再加入 0.2ml 新洗脱液，最后可以得到~0.4ml 洗脱液。

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

1. 取质粒 DNA，用 Buffer TE 补足至 0.9ml，加入 100 $\mu$ l Buffer E3 混匀，转移至 2.0ml 离心管中。
2. 加入 700 $\mu$ l 异丙醇，颠倒混匀 10~15 次，13,000  $\times$  g 离心 15 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 1.0ml 的 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. 加入适量灭菌水至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。