

## HiPure Plasmid EF Mega Kit

### 低内毒素质粒超大提试剂盒

本产品适合于从 100~500ml 细菌培养液中提取高达 2.5mg 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/μg，可直接用于细胞转染，动物注射等。

### 产 品 组 份

产 品 编 号	P1159-01	P1159-02	P1159-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	20 mg	2 × 40 mg
Buffer P1	26 ml	125 ml	2 × 330 ml
Buffer P2 Blue	26 ml	125 ml	2 × 330 ml
Buffer NS3	26 ml	125 ml	2 × 330 ml
Buffer ERS4	15 ml	90 ml	400 ml
Buffer GP	26 ml	125 ml	2 × 330 ml
Buffer EWVB	25 ml	100 ml	500 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer	10 ml	50 ml	200 ml
大量过滤器 B (60ml)	2	10	50
红色大柱 C7	2	10	50
50ml 离心管 (带垫片)	2	10	50
5ml 尖底离心管	2	10	50

版本：202510

## 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 可能会有沉淀形成，使用前 37℃水浴使沉淀完全溶解。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8℃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℃保存，有效期为 6 个月。
- 按瓶子标签所示，加入适量的乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
- 抽滤或离心操作：本产品适用于负压抽滤操作，也适合离心操作（水平转子和角度转子均可）。水平桶装离心机离心速度设为 5,000~6,000rpm (4000~4500 x g)或最高；角度离心机离心速度设为 8,000rpm (6000~7000 x g)。

## 实验步骤

1. 将单克隆菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10 ml 培养管中，37℃摇床培养 6~8 小时扩增菌液。

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℃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 0.5~1L 培养瓶中加入 100~250ml（高拷贝）含抗生素 LB 培养液，在 2L 培养瓶中加入 250~500ml（中低拷贝）含抗生素 LB 培养液，接种 0.1%初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养 14~16 小时，8,000rpm 离心 3 分钟收集 100~500ml 菌液。

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，则生物量最高为 600. 2 x 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。

3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 12 ml 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。

4. 加入 12 ml Buffer P2 Blue 至重悬液，颠倒混匀 10~15 次，室温静置 5 分钟，其间颠倒混匀 3~5 次直至菌体充分裂解。

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。

5. 加入 12 ml Buffer NS3 至裂解液中，立即颠倒 15~30 次或直至充分混匀形成蛋花状的悬浊液，8,000rpm 离心 10 分钟。

加入 Buffer NS3 后，应立即颠倒混匀。充分混匀后，产生的絮状沉淀是均一白色的。当菌液用量达 500ml 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 NS3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

6. 把上清液倒到新的离心管中，加入 0.2 倍上清液体积的 Buffer ERS4，颠倒混匀 15~30 次，室温放置 3~5 分钟，然后转移至-20°C 冰箱中放置 10 分钟沉淀内毒素。

离心后的上清液可以直接倒入新的离心管中，转移或倒入少量沉淀物不影响产量和纯度，第 7 步可过滤去除沉淀物，Buffer ERS4 可以高效沉淀内毒素。

7. 取出大量过滤器 C，缓慢取出活塞，把第 6 步的全部混合液倒入针筒中，出口对准离心管或合适大小的瓶子，静置 3 分钟让沉淀慢慢漂浮起来，插入活塞并缓慢推动活塞使裂解液过滤到合适容器中。

8. 测量滤液体积，加入 0.1 倍异丙醇或 0.25 倍 Buffer GP，颠倒混匀 10~15 次。

预期产量低于 1.2mg：中低拷贝载体载体质粒含量低（1ml 菌液中质粒产量低于 3ug），RNA 含量高，建议采用 Buffer GP 作为结合液（高盐介导吸附），该结合液特异性，只介导 DNA 吸附，可充分去除 RNA。

预期产量 1.2~2.0mg：处理中高拷贝载体（1ml 菌液中质粒产量低于 4ug），加入 0.1 倍异丙醇作为结合液，提高 DNA 结合效率同时，也能减少 RNA 的吸附，降低 RNA 污染风险。

预期产量超过 2.0mg：处理高拷贝载体（1ml 菌液中质粒产量低于 5ug），建议加入 0.15 倍体积异丙醇作为结合液，以提高柱子的最高载量能力。由于异丙醇越多，柱子吸附 RNA 的效率也会增加，所以预期质粒总量低于 1.5mg 时，不要加入 0.15 倍滤液体积的异丙醇。

9. 将红色大柱 C7 套在 50ml 收集管，转移不超余 16ml 混合液（不要超过 16ml）至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟。倒弃滤液把柱子套回收集管，重复这一步把余下混合液转移至柱子中并离心。

第 9~11 步可采用负压抽滤，依次加入 9ml EWB 和 9ml PW2 清洗柱子，当 PW2 抽滤后，加入 9ml 无水乙醇至柱子抽滤，最后空柱抽滤 15 分钟干燥滤膜，按第 15~16 步进行洗脱。

第 9~16 步也可以用水桶装桶装离心机，把离心速度调至最高(5000rpm)离心 3 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 9 ml Buffer EWB，8,000rpm 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 9 ml Buffer PW2，8,000rpm 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管，8,000 rpm 离心 10 分钟甩干柱子的滤膜。  
水平桶装离心机，速度调整至最高 (>5000rpm) 离心 15 分钟干燥柱子。
13. 取出红色大柱 C7，打开盖子，55 度烘干 5~10 分钟或室温放置 10~15 分钟干燥柱子。
14. 倒弃收集管的全部液体，并在吸水纸拍打几次吸尽残液晾干备用。
15. 放入一个 5.0ml 尖底离心管至收集管中，加入 1.5ml Elution Buffer 至柱子滤膜上，放回收集管中并把柱子底部插到 5ml 离心管中，静置 3 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。
16. 再加入 0.5~1.0ml Elution Buffer 至柱子滤膜上，静置 3 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟，丢弃柱子，取出 5ml 离心管，-20℃保存或待用。
  - 由于滤膜存在吸水性，~0.3ml 洗脱液损失，总洗脱体积用量不要低于 2500ul。
  - 采用异丙醇介导吸附时，质粒 DNA 中可能会含有 RNA 污染，OD260 吸光值升高，造成质粒 OD 浓度与电泳亮度不符合，用电泳校准核酸浓度后使用或用附加流程，异丙醇重沉淀去除 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。

### 附加流程：进一步纯化质粒 DNA（去除 RNA 污染）

1. 取质粒 DNA（第 16 步）至合适的离心管中，加入 0.1 倍 Buffer P1/RNase A，混匀，室温放置 15~30 分钟消化 RNA。
2. 重新计算混和液体积，加入 0.15 倍 Buffer NS3 和 0.8 倍体积异丙醇，颠倒 10-15 次。  
例：1ml 质粒，加入 0.1ml Buffer P1/RNase A，混匀静置后，加入 0.165ml Buffer NS3 和 0.88ml 异丙醇，转移 1.8~2.0 ml 混合液至数个 2.0ml 离心管，第三步可以用更方便的台式小型高速离心机。
3. 室温静置 10 min，13,000,000 rpm 离心 15 min，小心倒弃上清液。
4. 加入 1.0ml 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 rpm 离心 3 min，小心倒弃上清液。
5. 短暂离心收集管壁上的液滴，小心吸尽残液，空气干燥 10min。
6. 加入适量灭菌水或 Buffer TE 至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 10min 让质粒充分溶解。