

## HiPure Plasmid EF Maxi Kit

### 无内质粒大提质剂盒

本产品适合于从 100~200ml 细菌培养液中提取 100~1000 $\mu$ 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 1EU/ $\mu$ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

### 产品组份

产品编号	P1158-01	P1158-02	P1158-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	0.1 ml	10 mg	50 mg
Buffer P1	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer P2	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer LEN3	10 ml	40 ml	220 ml
Buffer LN4	45 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer CL (平衡液 CL)	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer EWB	20 ml	110 ml	550 ml
Buffer PW2	10 ml	50 ml	2 x 100 ml
Elution Buffer	3 ml	20 ml	120 ml
过滤中量器 (20ml)	2	10	50
黄色大柱 C7	2	10	50
50ml Collection Tube C	2	10	50

## 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℃ 摇床培养 6~8 小时小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单克隆菌种接种于 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 0.5~1.5L 培养瓶中加入 100~200ml 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 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 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。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 B30 最大结合力为 1000µg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 8,000rpm 离心 5 分钟，收集 100~200 ml 菌液。

4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 8ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋或吸打重悬细菌。

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 8ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 10~15 次。室温静置 5 分钟，期间颠倒数次直至细菌完全裂解。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一透亮。当菌液用量达 150ml 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，总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 加入 4 ml Buffer LEN3 至裂解液，立即颠倒 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状悬浊液，8,000rpm 离心 5 分钟。

加入 Buffer LEN3 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 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少的团块，让 Buffer LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 取出过滤器活塞，把第 6 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. 加入等倍体积的 Buffer LN4 至滤液中，颠倒 6~8 次，选择抽滤或离心方法进行过柱操作。

#### 离心操作

9. 将黄色大柱 C7 套在 50 ml 收集管 C 中，转移 2.5 ml Buffer CL，静置 3 分钟，10,000rpm 离心 3 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子套回收集管，转移 12~13 ml 混合液(第 8 步)至柱子中，8,000rpm 离心 3 分钟。

纯化柱的最大容积为 13ml，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 13ml，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，柱子中表层滤膜会脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。

11. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，重复第 10 步把混合液都转移至柱子并离心。

12. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10 ml Buffer EVB 至柱子，8,000rpm 离心 3 分钟。

13. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10 ml Buffer PW2 至柱子，8,000rpm 离心 3 分钟。

14. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10 ml Buffer PW2 至柱子，8,000rpm 离心 3 分钟。

15. 倒弃滤液把柱子套回收集管，8,000 rpm 离心 10 分钟甩干柱子。

倒弃收集管中的滤液，并在吸水纸拍打让滤液完全流尽，黄色大柱 C7 和收集管室温放置晾干 5-10 分钟，滤液含乙醇可以起灭菌作用，倒弃滤液干燥后，收集管可以用于第 16 步的质粒 DNA 收集。

16. 把柱子套回收集管 C 中，加入 0.8~1.0 ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 3 分钟，8000~10,000 rpm 离心 3 分钟。

17. 可选：加入 0.5~1.0ml Elution Buffer 至柱子膜中央，8000~10,000 rpm 离心 3 分钟。

## 18. 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~0.2ml 洗脱液损失，洗脱体积不建议低于 0.7ml，提高离心速度至 10000rpm 可以减少洗脱损失。
- 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。
- 本产品 LN4 含异硫氰酸胍，该盐在 230nm 有强烈的吸光值，当核酸浓度低于 200ng/ul，会造成 A260/230 低于 1.0，但不影响下游应用。

## 抽滤操作

9. 把黄色大柱 C7 插到真空适配管 VC02（另外订购）中，然后插到真空抽滤盒中。加入 2.5ml Buffer CL 至柱子中，静置 3 分钟。打开真空泵进行抽滤，当溶液过滤完毕后，加入 5ml 灭菌水至柱子中，当全部混合液过滤完毕，关闭真空泵，让压力归零。
10. 加入 15ml 混合液（第 8 步）至柱子，打开真空泵进行抽滤，继续倒入混合液至柱子中进行抽滤，当全部混合液过滤完毕，关闭真空泵，让压力归零。  
过滤时，柱子中表层滤膜有少量脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。及时倒入混合液，不要让柱子空抽，空抽时会产生大量气泡堵塞滤膜造成抽滤速度变慢。
11. 加入 10 ml Buffer EWB 至柱子，打开真空泵进行抽滤。
12. 当全部溶液过滤后，加入 10 ml Buffer PW2 至柱子进行抽滤，过滤后，再加入 10 ml Buffer PW2 至柱子进行抽滤。
13. 当全部溶液过滤后，再加入 5ml 无水乙醇至柱子，抽滤完毕后，进行抽滤 15 分钟干燥柱子。
14. 把柱子套在 50ml 收集管 C 中，加入 0.8~1.5 ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 3 分钟，8,000~10,000 rpm 离心 3 分钟。
15. 可选：加入 0.5~1.0ml Elution Buffer 至柱子膜中央，8000~10,000 rpm 离心 3 分钟。
16. 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~0.1ml 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或重新灭菌 Elution Buffer，以防止微生物感染。