

## HiPure Plasmid EF Mega Kit

### 低内质粒超大提试剂盒

本产品适用于从 100 - 500ml 细菌培养液中提取最高达 2.0mg 的低内毒素质粒 DNA。该产品运用独特的溶液体系，能够处理各类质粒载体，涵盖常规的高、中、低拷贝数载体以及大型载体，例如 BAC、Cosmid、P1 等。DNA 产量取决于载体拷贝数与菌液体积。纯化后的质粒内毒素含量低于 0.1EU/μg，可直接应用于细胞转染、动物注射等领域。

### 产品组分

产品编号	P1159-01	P1159-02	P1159-03
包装次数	2 次	10 次	40 次
RNase A *	0.1 ml	20 mg	60 mg
Buffer CL	3 ml	12 ml	50 ml
Buffer P1	25 ml	125 ml	500 ml
Buffer P2	25 ml	125 ml	500 ml
Buffer NS3	25 ml	125 ml	500 ml
Buffer ERS4	15 ml	80 ml	300 ml
Buffer GWP	11 ml	60 ml	220 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer (Endo-Free)	6 ml	30 ml	125 ml
Clear Mega Syringe B	2	10	40
红色大柱 C7	2	10	40
50ml 离心管（带垫片）	2	10	40
5ml 尖底离心管	2	10	40

版本：202601

## 保存条件

本产品可在室温条件下保存 18 个月。RNase A 可在室温下进行运输和保存，若需长期保存（超过 3 个月），则应置于-20 至 8℃环境中。在低温条件下，Buffer P2 可能会出现沉淀，使用前请将其置于 37℃水浴中直至沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 加入 0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉，吸打混匀溶解 RNase A，然后全部转移至 Buffer P1 中，若 RNase A 是液体的，短暂离心后转移至 Buffer P1 中，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)。
- 纯化大柱 C7 最高载量为 2mg，高拷贝载体建议用 200~250ml 菌液以降低内毒素水平。

## 实验步骤：上清液制备

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。

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中可能会丢失载体，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 200~250ml（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。

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. 8000 rpm 离心 5 分钟收集◆200~250 ml 或■250~500 ml 菌液，倒弃培养基，在吸水

纸上轻轻拍打以吸尽残液。

采用水平离心机，4000~5000rpm 离心 15 分钟可以充分收集细菌。

4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入◆10 ml 或■12 ml Buffer P1/RNase A 混合液至菌体中，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◆10 ml 或■12 ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 10~15 次，室温静置 3~5 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，整个溶液变成均一溶液而且透亮。

6. 加入◆10 ml 或■12 ml Buffer NS3 至裂解液中，立即颠倒 15~30 次或直至充分中和形成蛋花状的悬浊液，8000rpm 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。

7. 把上清液倒入新的离心管中，加入 0.2 倍上清液体积的 Buffer ERS4，颠倒混匀 15-20 次，室温放置 5 分钟，-20℃ 冰箱放置 10 分钟沉淀内毒素形成浑浊液。

上清可以直接倒入新离心管中，倒入少量沉淀不影响产量和纯度，过滤器可以去除沉淀。

8. 取出活塞，把混合液倒入针筒中，插入活塞并缓慢将液体挤到合适容器中，加入 0.1 倍滤液体积异丙醇，颠倒混匀 8~10 次，选择离心或抽滤过柱。

## B: 离心步骤

9. 将红色大柱 C7 套在 50ml 收集管中，加入 1.0ml Buffer CL 至柱子中，8,000 rpm 离心 1 分钟。

10. 转移不超过 15ml 混合液至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟，倒弃滤液并把柱子套回收集管中，重复这一步把余下混合液转移至柱子中并离心。

11. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 5 ml Buffer GWP，静置 3 分钟，8,000rpm 离心 1 分钟。

12. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 9 ml Buffer PW2，8,000rpm 离心 10 分钟。
13. 取出红色大柱 C7，60~65°C 烘干 10 分钟干燥柱子的滤膜，倒去收集管中的废液。
14. 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 2 分钟，8,000rpm 离心 3 分钟。  
这一步可洗脱出 60-75% DNA，若需最高浓度，省略第 15 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
15. 加入 1.0ml Elution Buffer 至柱子滤膜上，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，取出 5ml 离心管，-20°C 保存或待用。  
质粒保存过程中可能会产生沉淀，离心去除即可。

### C: 负压抽滤步骤

9. 把红色大柱 C7 插到真空抽滤盒中，加入 1.0ml Buffer CL 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，滤完后加入 5ml 灭菌水至柱子中抽滤，完毕后关闭真空泵。
10. 加入 15~17ml 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。
11. 加入 5 ml Buffer GWP 至柱子，静置 3 分钟，打开真空泵抽滤。
12. 完毕后加入 9 ml Buffer PW2 至柱子进行抽滤。
13. 完毕后加入 9ml 无水乙醇至柱子进行抽滤，完毕后再抽滤 15 分钟干燥柱子的滤膜。
14. 放入一个新的 5.0ml 尖底离心管至 50ml 收集管中，加入 1.5 ml Elution Buffer 至柱子的滤膜上，放回收集管并让柱子底部插到 5ml 离心管，静置 3 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。  
这一步可洗脱出 60-75% DNA，若需最高浓度，省略第 15 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
15. 加入 1.0ml Elution Buffer 至柱子滤膜上，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，取出 5ml 离心管，-20°C 保存或待用。  
质粒保存过程中可能会产生沉淀，离心去除即可。