

HiPure Plasmid EF Maxi Kit

低内质粒大提试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 100~300ml 细菌培养液中提取高浓度和高产量的低内毒素质粒 DNA，纯化的质粒产量高达 3mg，内毒素含量 $<1\text{EU}/\mu\text{g}$ ，浓度高达 $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，可直接用于细胞转染和动物注射等。60 分钟内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。

产品组分

产品编号	P1114-01	P1114-02	P1114-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	100 ul	20 mg	100 mg
Buffer E1	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer E2	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer E3	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer E4	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer E5	20 ml	100 ml	500 ml
Buffer PEW2*	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer (Endo-Free)	10 ml	30 ml	125 ml
Buffer ER2	1.8 ml	5 ml	15 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure EF Maxi Column	2	10	50
50ml Collection Tube	2	10	50

版本号：202601

保存条件

本产品在室温下保存 18 个月。RNase A 室温运输和保存，长期保存(>3 个月)放置于-20~8℃。

准备事项

- 加入 0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中, 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°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 PEW2, 于室温保存。
- 低温下, Buffer P2 和 Buffer E4 有沉淀析出, 于 55°C 温浴溶解。
- 本产品必须用水平桶状离心机, 不能用角度离心机。

实验步骤: 转染级质粒 DNA 提取

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。

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◆0.5L 培养瓶加入 100~200ml LB/抗生素培养液; 或在■2L 培养瓶中加入 200~300ml 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 14-16 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 × 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。纯化大柱最大结合力为 3mg, 用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。

3. 4,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集◆100~200ml 或■200~300ml 菌液, 倒弃培养基, 在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入◆8ml 或■10ml Buffer E1/RNase A 混合液, 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◆8ml 或■10ml Buffer E2 至重悬液, 温和地上下颠倒并转动离心管 10~15 次, 室温静置 3 分钟, 其间颠倒混匀 6-8 次。

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。混匀后溶液应变得黏稠而透亮。当菌液用量达 300ml 时, 裂解液会极为黏稠, 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, 并轻微振荡让菌体充分裂解, 形成均一无团块透光的裂解液, 总裂解时间不要超过 5 分钟。

- 加入◆8ml 或■10ml Buffer E3 至裂解液，稍快速上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液。4,000~5,000rpm 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 300ml 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，并轻微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。
- 取出过滤器活塞，把第 6 步的上清液倒入针筒，插入活塞缓慢挤出液体至 50ml 离心管中。
- 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4，颠倒 10~15 次，按离心步骤或抽滤步骤操作。

离心方案

- 将 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，转移不超过 20ml 混合液至柱子中，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管，重复把混合液转移至柱子中并离心过滤。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9ml Buffer E5，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9ml Buffer PEW2，4,000~5,000rpm 离心 10 分钟。
- 取出柱子，60~65°C 烘干柱子 10 分钟，倒弃收集管中的废液，晾干收集管备用。
Buffer PW2 和无水乙醇起灭菌作用，倒弃滤液干燥后，收集管可用于质粒 DNA 的收集。
- 把 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 3 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。
这一步可洗脱出 60-70% DNA，若需最高浓度，省略第 15 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
- 加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20°C 保存。

抽滤操作

- 把 HiPure EF Maxi Column 插到真空抽滤盒中，加入~20ml 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（不要让溶液完全滤完），当全部混合液过滤完毕，关闭真空泵，让压力归零。
- 加入 9 ml Buffer E5 至柱子，打开真空泵进行抽滤，滤完后再抽滤 3 分钟。
- 加入 9 ml Buffer PEW2 至柱子进行抽滤。
- 滤完后加入 5 ml 无水乙醇至柱子抽滤，滤完后再抽滤 15 分钟干燥柱子的滤膜。

13. 把 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。

这一步可洗脱出 60-70% DNA，若需最高浓度，省略第 14 步的二次洗脱或两次洗脱分开。

14. 加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20℃ 保存。

附加流程：无内质粒 DNA 纯化 (0.1EU/μg)

1. 取质粒 DNA，加入适量灭菌水至总体积为 1.9ml，然后加入 0.1ml Buffer E1/RNase 混匀，把 DNA 分成两份，每份 1.0ml 至 1.5ml 离心管中，静置 10 分钟消化残留 RNA。
2. 每管加入 110μl Buffer E3 和 110μl Buffer ER2，颠倒混匀 10~15 次，冰上（或 2-8℃ 冰箱）放置 10 分钟，42~55℃ 温育 5 分钟沉淀内毒素形成浑浊液。
低温下，Buffer ER2 溶于水并与内毒素分子结合。超过 15℃ 时，Buffer ER2 和内毒素会形成液滴状液泡结构并不溶于水，可以通过离心去除。
3. 室温下，13,000 x g 离心 10 分钟，转移上层上清液至新的离心管中。
4. 转移上清液至 2.0 ml 离心管中，加入 0.7 倍体积的异丙醇，颠倒混匀 10 次，室温放置 10 分钟，13,000 x g 离心 10 分钟。
5. 小心倒弃上清液，加入 1.0 ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 x g 离心 3 分钟。
6. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 10min。
7. 加入适量的 Elution Buffer(Endo Free)至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解，把两管质粒合并成一管，保存于-20℃。