

HiPure Plasmid/BAC EF Mini Kit B

无内质粒小中提试剂盒 B

本产品适合于从 5~15ml 细菌培养液中提取 10~100 μ 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/ μ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

产品组分

产品编号	P1154-01B	P1154-02B	P1154-03B
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	50 μ l	5 mg	20 mg
Buffer CL	1.2 ml	6 ml	30 ml
Buffer P1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer NS3	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer ER2	5 ml	10 ml	40 ml
Buffer GWP	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer PW2	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer (Endo-Free)	1.8 ml	30 ml	60 ml
HiPure DNA Mini Column C6	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

版本号：202601

保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 室温运输和保存,长期保存(>3 个月)放置于-20~-8℃。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。
- 2026 年 01 月升级,柱子升级为 HiPure DNA Mini Column C6,最高载量可达至 100µg,受湿气温度等贮藏条件影响,吸附柱最高结合力会下降,超过生产日期 8 个月或发现异常时,建议激活柱子以提高柱子最高载量。实验前将吸附柱装在收集管中,加入 100 µl Buffer CL 至柱子滤膜上,13,000×g 离心 60 秒,倒弃滤液把柱子装回收集管中备用。

实验步骤 (转染级)

1. **转移 5~15ml 培养过夜的大肠杆菌培养液 (LB 培养基) 到 15ml 离心管中,4,000~5,000 × g 离心 10 分钟,倒弃培养液,反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。**
培养方法: 在无菌条件下,用灭菌牙签挑取一单菌落,转移 5~15ml 含相应抗生素的 LB 培养基中,37℃ 摇床(220-280rpm)培养 14-16 小时。培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍,平板挑菌培养时,可能会存在一些菌株生长缓慢。2 × YT 或 TB 培养液因菌体密度很高,菌液用量不应超过 6ml。2 × 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。
2. **加入 500µl Buffer P1 /RNase A,涡旋让菌体充分重悬,转移至 2.0ml 离心管中。**
使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1 中,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。未打散菌块会影响裂解而造成产量和纯度降低。
3. **往重悬液中加入 500µl Buffer P2,上下翻转 10~15 次使菌体充分裂解,室温静置 3 分钟,其间上下翻转数次。**
涡旋会造成基因组污染,混匀后溶液应变得黏稠而透亮。若溶液未能变得清亮,可能菌体过多

而裂解不彻底，下次实验减少菌体用量或增加Buffer P1, Buffer P2和Buffer NS3用量。当菌液用量达15ml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，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过5分钟。

4. **加入500 μ l Buffer NS3，立即上下翻转10~15次让溶液充分中和形成蛋花状悬浊液。**

加入Buffer NS3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15ml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 NS3完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

5. **13,000 \times g 离心10分钟，转移上清液至新的离心管中。**

若转移的上清液中仍含有杂质，重复离心后再转移上清液至新的离心管中。

6. **加入1/10倍体积Buffer ER2，颠倒数次，加入1/3倍液体体积的异丙醇，颠倒混匀数次。**

例：1.3ml上清液，加入130 μ l Buffer ER2和433 μ l异丙醇。

7. **将HiPure DNA Mini Column C6装在收集管，转移750 μ l混合液至柱子，13,000 \times g离心1分钟，重复这一步直到混合液都转移至柱子并离心。**

生产日期超过8个月时或发现异常时，使用前用100 μ l Buffer CL激活吸附柱以提高载量。

8. **倒弃滤液把柱子套回收集管，加入450 μ l Buffer GWP至柱子，静置2分钟，13,000 \times g离心1分钟。**

9. **倒弃滤液把柱子套回收集管，加入450 μ l Buffer PW2至柱子，13,000 \times g离心1分钟。**

10. **倒弃滤液把柱子套回收集管，加入450 μ l Buffer PW2至柱子，13,000 \times g离心1分钟。**

11. **倒弃滤液把柱子套回收集管中，13,000 \times g离心3分钟甩干柱子。**

12. **把柱子套在1.5ml离心管中，加入60~100 μ l Elution Buffer (Endo-Free) 至柱子膜中央，静置2分钟，13,000 \times g离心1分钟洗脱DNA，弃去柱子，把质粒保存于-20 $^{\circ}$ C。**

● 柱子最低的洗脱体积为60 μ l。低于60 μ l会导致洗脱效率下降。

附加步骤：无内质粒制备 (0.1EU/ μ g)

1. 取质粒 DNA (第 12 步) 至 1.5ml 离心管中, 补加 Elution Buffer 至总体积为 500 μ l。
2. 加入 50 μ l Buffer NS3 和 50 μ l Buffer ER2, 颠倒混匀 10~15 次, 冰上 (或 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱) 放置 10 分钟。
低温下, Buffer ER2 溶于水并与内毒素分子结合。超过 15 $^{\circ}$ C 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。若实验室温度低于 15 $^{\circ}$ C 时, 冰浴 10 分钟后, 45~50 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟形成浑浊液后再按第三步进行离心。
3. 室温下, 13,000 \times g 离心 10 分钟, 转移上层上清液至新的离心管中。
离心后在管底形成红色液层, 若离心后没有分层, 再颠倒混匀, 45~50 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟, 重复离心并确保离心机恢复至室温。
4. 转移上清液至 1.5ml 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 \times g 离心 10 分钟。
5. 小心倒弃上清液, 加入 0.5 ml 的 75%乙醇, 涡旋 5 秒, 13,000 \times 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 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。