

HiPure Plasmid EF Midi Kit B

无内质粒中提试剂盒 B (通用型)

本产品适合于从 50~75ml 细菌培养液中提取 50~350 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 0.5EU/ μ g,可直接用于细胞转染,动物注射等。

产品组分

产品编号	P1155-01B	P1155-02B	P1155-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	50 μ l	10 mg	20 mg
Buffer CL	1.2 ml	6 ml	30 ml
Buffer P1	8 ml	33 ml	180 ml
Buffer P2	8 ml	33 ml	180 ml
Buffer LEN3	4 ml	20 ml	90 ml
Buffer LN4	16 ml	90 ml	2 x 210 ml
Buffer PW1	5 ml	22 ml	110 ml
Buffer EWB	5 ml	22 ml	110 ml
Buffer PW2*	6 ml	10 ml	50 ml
Elution Buffer (Endo Free)	1.8 ml	15 ml	60 ml
Clear Mini Syringe	2	10	50
HiPure DNA Midi Column C6	2	10	50
15 ml 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℃。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，37℃水浴使沉淀完全溶解。Buffer LN4 在存放过程中会变成黄色，不同批次的 Buffer LN4 有色差是正常现象。

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 P1，2-8℃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. 将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37℃摇床培养 6~8 小时进行小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单菌落接种于 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中可能会丢失载体，先划平板进行活化，用灭菌牙签挑取单菌落进行初步培养。

2. 在 250ml 培养瓶加入 50~75ml LB/抗生素培养液，接种 0.1%初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养 12-16 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。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。使用 YT 或 TB 培养液时，因菌体密度很高，建议不要超过 20~30ml。纯化中柱最大结合力为 350µg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集 50~75ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入 3ml Buffer P1/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 3ml Buffer P2 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。当菌液用量达 75ml 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。

6. 加入 1.5ml Buffer LEN3 至裂解液，上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液，4,000~5,000 rpm 离心 10 分钟。

加入 Buffer LEN3 后应立即上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量达 75ml 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小的团块，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，把上清液倒入过滤器中，推动活塞使上清液过滤到合适的离心管中。

8. 加入等倍滤液体积的 Buffer LN4，颠倒混匀 6~8 次。

9. 柱子激活：将 HiPure DNA Midi Column C6 套在 15ml 收集管中，加入 0.5ml Buffer CL 至柱子滤膜上，5,000rpm 离心 2 分钟。

为更方便操作，第 9-14 步可以用负压抽滤操作，负压抽滤设备可选用美基的 MagVac-20。抽滤操作时加入 0.5ml Buffer CL 至柱子中，静置 5 分钟后抽滤，然后依次加入 1ml 灭菌水，上清液，Buffer PW1，EWB，Buffer PW2 至柱子中抽滤，滤完后再加入 2ml 无水乙醇至柱子抽滤，滤完后再次抽滤 15 分钟干燥柱子的滤膜，按第 15 步进行操作。

10. 转移 4ml 混合液（第 8 步）至纯化中柱 C6，5,000rpm 离心 2 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管，重复这一步直至全部上清液都转移至柱子并离心。

这一步需要重复 3-4 次才能把全部上清过滤完毕。

11. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 2ml Buffer PW1，5,000rpm 离心 2 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 2ml Buffer EWB，5,000rpm 离心 2 分钟。
13. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 4ml Buffer PW2，5,000 rpm 离心 10 分钟。
14. 取出纯化中柱，室温放置 10 分钟晾干柱子的滤膜，倒去收集管中的废液，在吸水纸拍打吸弃液体晾干备用。

Buffer PW2 含 80%乙醇可以起到浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，离心管中可以用于第 15 步的质粒 DNA 收集。

15. 把柱子套在收集管中，加入 0.4ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，5,000 rpm 离心 2 分钟。

这一步可洗脱出 70% DNA，若需最高浓度，省略第 16 步的二次洗脱或两次洗脱分开。

16. 加入 0.2ml Elution Buffer [Endo Free]至柱子膜中央，静置 2 分钟，5,000 rpm 离心 2 分钟。弃去柱子，把 DNA 保存于-20°C。

● 由于滤膜存在吸水性，会有~0.15ml 洗脱液损失。洗脱体积不建议低于 0.5ml。