

HiPure Plasmid EF Maxi Kit

无内质粒大提质剂盒

本产品适合于从 100~300ml 细菌培养液中提取 100~1500 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 0.1EU/ μ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

产品组份

产品编号	P1156-01	P1156-02	P1156-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A *	0.2 ml	20 mg	100 mg
Buffer P1	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer P2	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer LN3	11 ml	60 ml	270 ml
Buffer GWP	11 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer (Endo-Free)	10 ml	30 ml	125 ml
Buffer CL	3 ml	12 ml	60 ml
Blue Plus	500 μ l	1 ml	3 ml
Buffer ER2	6 ml	30 ml	150 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure DNA Maxi Column C	2	10	50
50ml Collection Tube C	4	20	100

版本：202601

P1156-03 装箱备注：A 盒：试剂 B 盒：离心管+针筒 C 盒：离心管+黄色大柱

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。
- Blue Plus 特殊的颜色反应,有利于监控碱裂解过程。Blue Plus 可预先添加到 Buffer P1 中。由于 Blue Plus 不溶解于 Buffer P1 中,添加 Blue Plus 后,Buffer P1 会产生少量沉淀,使用前要摇匀。按 1ml Buffer P1 加入 4ul Blue Plus。
- 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: 低内质粒提取

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 h 小量扩增菌液。

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 1~1.5L 培养瓶中加入 100~300ml 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。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,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。纯化大柱最大结合力为 1500µg,用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 8,000rpm 离心 3 分钟,收集◆100~200ml (高拷贝)或●200~300ml (中低拷贝)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 或●10ml 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◆8ml 或●10ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 8~15 次。室温静置 3~5 分钟，其间颠倒混匀数次直至完全裂解。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。当菌液用量达 150ml/250ml 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，总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 加入◆4ml 或●5ml Buffer LN3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状的悬浊液。8,000rpm 离心 3 分钟。

加入 Buffer LN3 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/250ml 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 LN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 取出过滤器活塞，把上清液倒入针筒，插入活塞缓慢挤出液体至 50ml 离心管中。

8. 加入 0.1 倍体积 Buffer ER2 至滤液中，颠倒 10-15 次。

9. 按简易方案或高敏方案进行操作。

● 简易方案: 加入 0.5 倍体积无水乙醇至混合液中，颠倒混匀 8~10 次，按第 10 步操作。

无水乙醇体积=0.5 × (滤液体积+Buffer ER2 的体积)。

● 高敏方案: 冰上或 2-8°C 冰箱放置 10~15 分钟，50~55°C 温育 5 分钟形成悬浊液。室温 8,000 rpm 离心 10 分钟（离心机下降速度调整至最慢），转移上清液至新离心管中，加入 0.5 倍上清液体积的无水乙醇，颠倒 8~10 次，按第 10 步操作。

把离心机下降速度调整至最慢，让 Buffer ER2(Triton X114)形成的小囊泡充分沉淀。若离心后仍有大量液滴漂浮，重新离心并调整离心机下降速度为最慢。无法分层时，可以加入 0.1 倍滤液体积的氯仿或 Buffer BCP(氯仿代替物)至混合液中，涡旋混匀 10 秒再离心。

10. 将 HiPure DNA Maxi Column C 套在 50 ml 收集管中，转移 1.0 ml Buffer CL 至柱子中，8,000 rpm 离心 1 分钟。

负压抽滤: 订购配件 VC2-10，第 10~13 步可以用更快捷的抽滤方式进行操作。加入 1.0 ml Buffer CL 柱子静置 3 分钟后抽滤，然后依次加入 5ml 灭菌水，混合液(第 9 步)，清洗液 PWA，和清洗液 PW2 至柱子抽滤，加入 5ml 无水乙醇至柱子中，滤完后再抽滤 15 分钟干燥柱子的滤膜，按第 15 步进行洗脱。

11. 转移 10~13ml 混合液(第 9 步)至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管，重复这一步直至混合液都转移至柱子并离心。

纯化柱的最大容积为 13ml，需要分 3 次过柱。

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

202601 版本，Buffer PW1 升级为 Buffer GWP 以提高 RNA 清洗效率，让 OD 浓度更加真实。若需保持旧方案，取 3.6ml Buffer GWP 加入 1.4ml 异丙醇混匀后使用。

13. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9 ml Buffer PW2 至柱子中，8,000rpm 离心 10 分钟。

14. 取出柱子（柱子底部不要碰到滤液），打开盖子，室温放置 10~15 分钟晾干柱子的滤膜。

操作时若柱子底部碰到滤液，倒弃滤液再离心 3 分钟甩干柱子，在室温晾干柱子。

15. 把柱子套在新的收集管 C 中，加入 0.8 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 2 分钟。

这一步可洗脱出 60-75% 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 0.8ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 2 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20℃ 保存。

质粒保存过程中可能会产生沉淀，离心去除即可。

附加流程：无内质粒 DNA 纯化 (0.1EU/ μ g DNA)

1. 取质粒 DNA 至 2.0ml 离心管中，加入 0.1 倍 Buffer LN3 和 0.1 倍 Buffer ER2，颠倒数次。

例：1.5ml 质粒 DNA，则需加入 150ul Buffer LN3 和 150ul Buffer ER2。

2. 冰上（或 2-8℃ 冰箱）放置 10~15 分钟，其间颠倒数次。

低温下，Buffer ER2 溶于水并与内毒素分子结合，超过 15℃ 时，Buffer ER2 和内毒素会形成囊泡小体且不溶。若实验室温度低于 15℃ 时，冰浴后，45~50℃ 温育 5 分钟后再按 3 步操作。

3. 室温下，13,000 x g 离心 15 分钟，转移上清液至新的离心管中。

离心后管底分层成红色液层，若没有形成分层，颠倒数次，45-50℃ 温育 5 分钟再重复离心，并确保离心机已完全恢复至室温。

4. 加入 0.7 倍体积异丙醇，颠倒 10-15 次，静置 10 分钟，13,000 x g 离心 15 分钟。

为更方便操作，可以把混合液转移至数个 1.5-2.0ml 离心管中进行操作。

5. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 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。短暂离心吸尽所有残液，空气干燥 5~10 分钟。

7. 加入适量 Elution Buffer (Endo Free)，涡旋混匀，室温放置 5-10 分钟溶解质粒。