

HiPure Plasmid EF Maxi Kit

无内质粒大提试剂盒

本产品适合于从 100~200ml 细菌培养液中提取 100~1000 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 | P1158-01 | P1158-02 | P1158-03 |
|----------------------------|----------|----------|------------|
| 包装次数 | 2 次 | 10 次 | 50 次 |
| RNase A * | 0.1 ml | 10 mg | 50 mg |
| Buffer P1 | 20 ml | 90 ml | 450 ml |
| Buffer P2 | 20 ml | 90 ml | 450 ml |
| Buffer LEN3 | 10 ml | 45 ml | 220 ml |
| Buffer LN4 | 45 ml | 220 ml | 2 x 550 ml |
| Buffer CL | 3 ml | 12 ml | 60 ml |
| Buffer EWB | 20 ml | 100 ml | 500 ml |
| Buffer PW2 | 6 ml | 20 ml | 100 ml |
| Elution Buffer (Endo-Free) | 3 ml | 30 ml | 125 ml |
| Clear Maxi Syringe B | 2 | 10 | 50 |
| 黄色大柱 C7 | 2 | 10 | 50 |
| 50ml Collection Tube C | 2 | 10 | 50 |

版本：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。

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。
- 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 小时小量扩增。

培养方法: 在无菌条件下,用灭菌牙签挑取单克隆菌种接种于 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,用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。

2. 在 0.5~1.5L 培养瓶中加入 100~200ml 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 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。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。黄色大柱 C7 最大结合力为 1000µg,用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 8,000rpm 离心 5 分钟收集 100~200 ml 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 Buffer P1/RNase A 至菌体中,高速涡旋或吸打重悬细菌。

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 Buffer P2 至重悬液,颠倒混匀 10~15 次,室温静置 5 分钟,其间颠倒数次直至细菌完全裂解。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后,整个溶液变成均一透亮。当菌液用量达 150ml 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。

- 加入 4 ml Buffer LEN3 至裂解液，立即颠倒 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状悬浊液。

加入 Buffer LEN3 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 200ml 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少的团块，让 Buffer LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

- (可选) 8,000rpm 离心 5 分钟。
- 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。
简便操作时可省略第 7 步离心，把第 6 步的中和液全部倒入针筒中，静置 5~10 分钟让沉淀漂浮到表面，插入活塞并缓慢挤出液体到合适容器中，余下~3ml 沉淀物弃去以免挤出杂质。
- 加入等倍体积的 Buffer LN4 至滤液中，颠倒 6~8 次，选择抽滤或离心方法进行过柱操作。

离心操作

- 将黄色大柱 C7 套在 50 ml 收集管 C 中，转移 1.0 ml Buffer CL，8,000rpm 离心 2 分钟。
- 转移~13 ml 混合液(第 9 步)至柱子中，8,000rpm 离心 2 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管中，重复这一步把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。若离心机转子倾角较大，建议加入不超过 13ml，以防产生漏液现象。受离心机角度影响，以及大量试剂反复过柱，柱子中表层滤膜会脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9 ml Buffer EVW2 至柱子，8,000rpm 离心 2 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9 ml Buffer PW2 至柱子，8,000rpm 离心 2 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 5 ml 无水乙醇至柱子，8,000rpm 离心 10 分钟。
- 取出柱子（柱子底部不要碰到滤液），打开盖子，室温放置 10 分钟晾干柱子的滤膜。倒去收集管的液体，在吸水纸拍打几次吸尽残液，晾干备用。
80%乙醇(PW2)可以起到浸泡灭菌作用，倒弃滤液晾干后，收集管 C 可用于第 16 步收集质粒。
- 把柱子套回收集管 C 中，加入 0.7 ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子膜中央，静置 3 分钟，8000 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 17 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
- 加入 0.7ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子膜中央，8000 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。

- 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 0.8ml。
- 本产品 LN4 含异硫氰酸胍，该盐在 230nm 有强烈的吸光值，当核酸总量低于 1mg 时，A260/230 比值有可能低于 1.0，是本产品正常现象，不影响下游应用。

抽滤操作

10. 把黄色大柱 C7 插到真空适配管 VC02（另外订购）中，然后插到真空抽滤盒中。加入 1.0ml Buffer CL 至柱子中，静置 5 分钟。打开真空泵进行抽滤，滤完后，加入 5ml 灭菌水，滤完后，关闭真空泵，让压力归零。
11. 加入~14ml 混合液（第 9 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。
过滤时，柱子中表层滤膜有少量脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。及时倒入混合液，不要让柱子空抽，空抽时会产生大量气泡堵塞滤膜造成抽滤速度变慢。
12. 加入 9 ml Buffer EWB 至柱子，打开真空泵进行抽滤。
13. 滤完后加入 9 ml Buffer PW2 抽滤。
14. 滤完后加入 9ml 无水乙醇至柱子抽滤。
15. 滤完后再抽滤 15 分钟干燥柱子。
16. 把柱子套回收集管 C 中，加入 0.7 ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子膜中央，静置 3 分钟，8000 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 17 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
17. 加入 0.7ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子膜中央，8000 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。
 - 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 0.8ml。
 - 本产品 LN4 含异硫氰酸胍，该盐在 230nm 有强烈的吸光值，当核酸总量低于 1mg 时，A260/230 比值有可能低于 1.0，是本产品正常现象，不影响下游应用。