

## HiPure Plasmid EF Maxi Kit B

### 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 100~1500 $\mu$ g 无内毒素的质粒 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/ $\mu$ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

### 产品组分

产品编号	P1158-01B	P1158-02B	P1158-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A *	50 $\mu$ l	10 mg	40 mg
Buffer CL	3 ml	12 ml	60 ml
Buffer P1	15 ml	80 ml	380 ml
Buffer P2	15 ml	80 ml	380 ml
Buffer NS3	15 ml	80 ml	380 ml
Buffer ERS4	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer LN4	45 ml	200 ml	2 x 450 ml
Buffer EWB	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer PW2	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer (Endo-Free)	10 ml	30 ml	125 ml
Clear Maxi Syringe B	2	10	50
红色大柱 C7	2	10	50
5ml 尖底离心管	2	10	50
50ml 收集管 (垫片)	2	10	50

## 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,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。
- 抽滤或离心操作:本产品适用于负压抽滤操作,也适合离心操作(水平转子和角度转子均可)。水平桶装离心机离心速度设为 5,000~6,000rpm (4000~4500 x g)或最高;角度离心机离心速度设为 8,000rpm (6000~7000 x g)。

## 第一部分:上清液制备步骤

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 小时小量扩增菌液。

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 0.5~1.0L 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。纯化大柱 B30 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 100~200ml 菌液。
4. 倒弃培养基,在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液,加入 7ml Buffer P1/RNase A 混合液至菌体中,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 7ml Buffer P2 至重悬液,颠倒混匀 10~15 次,室温静置 3 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 200ml 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 7ml Buffer NS3 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，按转染级质粒制备或无内毒素质粒制备。

加入 Buffer NS3 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 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 LENS3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

**转染级质粒 DNA（快速）：**

7. 取出过滤器活塞，把第 6 步的混合液倒入针筒，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。

8. 测量滤液体积，加入 0.7 倍体积 Buffer LN4，颠倒 8~10 次，选择抽滤或离心方法进行过柱操作。

**无内质粒制备 (<0.1EU/ug 质粒制备)：**

7. 8000rpm 离心 10 分钟，把上清液倒入新的离心管中，加入 0.2 倍体积的 Buffer ERS4 至上清液，颠倒混匀 15-20 次，室温静置 5 分钟，-20°C 冰箱中放置 10 分钟沉淀内毒素形成浑浊液。

上清可以直接倒入新离心管中，倒入少量沉淀物不影响产量和纯度，过滤器可以去除沉淀。

8. 取出活塞，把混合液倒入针筒中，插入活塞并缓慢挤出液体到容器中，加入 0.6 倍滤液体积 Buffer LN4，颠倒混匀 8~10 次，选择抽滤或离心方法进行过柱操作。

## 第二部分：过柱纯化

### α：离心操作步骤

1. 将红色大柱 C7 套在 50ml 收集管中，加入 1.0 ml Buffer CL，8,000 rpm 离心 1 分钟。

2. 转移不超过 15 ml 混合液[第 8 步]至柱子，8,000rpm 离心 1 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管，重复这一步把混合液转移至柱子并离心。

纯化柱的最大容积为 15ml，需要分 3 次过柱。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。

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

4. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 8 ml Buffer PW2 至柱子，8,000rpm 离心 1 分钟。

5. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 8 ml 无水乙醇至柱子，8,000rpm 离心 10 分钟。
6. 取出红色大柱 C7，室温放置 15~20 分钟干燥滤膜，倒去废液并晾干收集管。
7. 放入一个 5.0ml 尖底离心管至收集管中，加入 1.5ml Elution Buffer (Endo-Free)至滤膜中，然后把吸附柱放入收集管中并让柱子底部插到小离心管中，静置 2 分钟，8,000rpm 离心 3 分钟。  
这一步可洗脱出 60-75% DNA，若需最高浓度，省略第 8 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
8. 加入 1.0ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子滤膜上，8,000 rpm 离心 3 分钟丢弃柱子，取出 5ml 离心管，-20℃保存或待用。
  - 由于滤膜存在吸水性，会有~0.25ml 洗脱液损失，洗脱体积不建议低于 1.0ml。
  - 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，但不影响下游应用。

## b: 负压抽滤

1. 把红色大柱 C7 插到真空抽滤盒中，加入 1.0ml Buffer CL 至柱子中，静置 3 分钟，打开真空泵进行抽滤，滤完后关闭真空泵。
2. 加入 15~17ml 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，当全部混合液过滤完毕，关闭真空泵，让压力归零。
3. 加入 8 ml Buffer EWB 至柱子，打开真空泵进行抽滤。
4. 当全部溶液过滤后，加入 8 ml Buffer PW2 至柱子进行抽滤。
5. 当全部溶液过滤后，加入 8 ml 无水乙醇至柱子进行抽滤，当溶液抽滤完后再抽滤 15 分钟干燥柱子。
6. 放入一个 5.0ml 尖底离心管至收集管中，加入 1.5ml Elution Buffer (Endo-Free)至滤膜中，然后把吸附柱放入收集管中并让柱子底部插到小离心管中，静置 2 分钟，8,000rpm 离心 3 分钟。  
这一步可洗脱出 60-75% DNA，若需最高浓度，省略第 8 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
7. 加入 1.0ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子滤膜上，8,000 rpm 离心 3 分钟丢弃柱子，取出 5ml 离心管，-20℃保存或待用。
  - 由于滤膜存在吸水性，会有~0.25ml 洗脱液损失，洗脱体积不建议低于 1.0ml。
  - 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，但不影响下游应用。