

## HiPure Plasmid EF Maxi Kit B

### 低内质粒大提试剂盒 B

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 100~300ml 细菌培养液中提取高浓度和高产量的低内毒素质粒 DNA，纯化的质粒产量高达 5mg，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 3μg/μl，可直接用于细胞转染或动物注射等。60 分钟内可以完成整个抽提工作，操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀。

### 产品组分

产品编号	P1114-01B	P1114-02B	P1114-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	100 ul	20 mg	100 mg
Buffer E1	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer E2	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer E3	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer E4	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer ETR	20 ml	100 ml	500 ml
Buffer PEW2	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer (Endo-Free)	10 ml	30 ml	125 ml
Buffer ERS1	1.2 ml	6 ml	30 ml
Buffer ERS2	1.2 ml	6 ml	30 ml
Clear Maxi Syringe (30ml)	2	10	50
红色大柱 E6	2	10	50
50ml 收集管 (带垫片)	2	10	50
5ml 尖底离心管	2	10	50

版本号：202601

P1114-03B 装盒备注：A 盒：试剂+酶 B 盒：针筒 C 盒：针筒+柱子 D 盒：离心管

## 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℃。

## 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。
- 低温下，Buffer P2 和 Buffer E4 有沉淀析出，于 55℃温浴溶解。
- 使用水平离心机，离心速度调整至 4500-5000 x g。使用角度离心机时，离心速度调整至 8000rpm。

## 实验步骤：转染级质粒提取

1. 将单克隆菌斑接种于含 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。

培养方法：在无茵条件下，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◆1L 培养瓶加入 100~250 ml LB/抗生素培养液；或在■2L 培养瓶中加入 250~300ml 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 14-16 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。本产品不要用 TB 或 2 x YT 等丰富培养基进行培养细菌，使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。

3. 8000 rpm 离心 5 分钟收集◆100~250 ml 或■250~300 ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

采用水平离心机，5000rpm 离心 15 分钟可以充分收集细菌。

4. 加入◆8 ml 或■10 ml Buffer E1/RNase A，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

充分重悬对产量很关键，重悬后应看不到明显菌块。若涡旋未能打散菌块，用移液器吸打数次。

- 加入◆8 ml 或■10 ml Buffer E2，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，整个溶液变成均一溶液而且透亮。涡旋会造成基因组污染。当菌液用量达 300ml 时，裂解液会极为黏稠，属高密度碱裂解类型，混匀时需要更多颠倒和翻转动作，并轻微振荡让菌体充分裂解形成均一无团块透光裂解液，总裂解时间不要超过 5 分钟。

- 加入◆8 ml 或■10 ml Buffer E3 至裂解液，立即上下颠倒 15~20 次或直至形成蛋花状混合液，8,000 rpm 离心 5 分钟。

加入 Buffer E3 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 300ml 时，属于高密度碱裂解中和类型，中和时会形成大块且紧密沉淀团，混匀时需要更多颠倒和翻转动作，并轻微振荡让大块沉淀团分散成较少团块，让 Buffer E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。采用水平离心机，5000rpm 离心 10 分钟就可以充分收集细菌。

- 取出过滤器活塞，把第 6 步的上清液倒入针筒，插入活塞缓慢挤出液体至 50ml 收集管中。
- 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4，颠倒 10~15 次，按离心操作或抽滤操作。

#### 离心操作

- 将红色大柱 E6 套在 50ml 收集管，转移不超过 15ml 混合液至柱子中，8,000 rpm 离心 1 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管，重复把混合液转移至柱子中并离心过滤。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9 ml Buffer ETR，8,000 rpm 离心 1 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9 ml Buffer PEW2，8,000 rpm 离心 10 分钟。
- 取出柱子，60~65°C 烘干 10 分钟干燥柱子的滤膜，倒弃收集管中的废液。
- 放入一个 5ml 尖底离心管至收集管中，插入红色大柱 E6，并让底部对准 5ml 离心管口，加入 1.5ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子滤膜中，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。这一步可洗脱出 60-70% DNA，若需最高浓度，省略第 15 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
- 加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子滤膜中，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟，弃子柱子，取出 5ml 离心管中，把质粒 DNA 保存于-20°C 或待用。

## 抽滤操作

9. 把红色大柱 E6 插到真空抽滤盒中，加入 15~16 ml 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（不要让溶液完全滤完），当全部混合液过滤完毕，关闭真空泵，让压力归零。
10. 加入 9 ml Buffer ETR 至柱子，打开真空泵进行抽滤，滤完后再抽滤 3 分钟。
11. 加入 9 ml Buffer PEW2 至柱子进行抽滤。
12. 滤完后加入 5 ml 无水乙醇至柱子抽滤，滤完后再抽滤 15 分钟干燥柱子的滤膜。
13. 放入一个 5ml 尖底离心管至收集管中，插入红色大柱 E6，并让底部对准 5ml 离心管口，加入 1.5ml Elution Buffer (Endo-Free) 至柱子滤膜中，静置 3 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。这一步可洗脱出 60-70% DNA，若需最高浓度，省略第 14 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
14. 加入 1.0~1.5 ml Elution Buffer (Endo-Free) 至柱子滤膜中，静置 3 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟，弃去柱子，取出 5ml 离心管中，把质粒 DNA 保存于-20°C 或待用。

## 附加流程：无内质粒 DNA 纯化 (0.1EU/μg)

1. 取质粒 DNA，加入适量灭菌水至总体积为 2.8ml，加入 0.2ml Buffer E1/RNase 混匀，分成三份，每份 1.0ml 至 1.5~2.0ml 离心管中，静置 10 分钟降解残留 RNA。
2. 每管加入 0.2ml Buffer ERS1，涡旋混匀，放置 10 分钟，其间颠倒数次。
3. 每管加入 0.2ml Buffer ERS2，涡旋混匀沉淀内毒素，室温下 13,000 x g 离心 5 分钟。
4. 转移上清液至 2.0ml 离心管中，加入 0.7 倍上清液体积的异丙醇，涡旋混匀 10 秒，静置 10 分钟，室温 13,000 x g 离心 15 分钟沉淀质粒 DNA。
5. 小心倒弃上清液，每管加入 1.0ml 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 x g 离心 5 分钟。
6. 小心倒弃上清液，短暂离心，吸尽所有残液，不要吸到白色沉淀，空气干燥 5min。
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，合并质粒 DNA 至一个离心管中，保存于-20°C 或待用。