

HiPure Plasmid EF Maxi Kit

低内质粒大提试剂盒

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 3mg，内毒素含量 $<1\text{EU}/\mu\text{g}$ ，浓度高达 $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，可直接用于细胞转染和动物注射等。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 | P1114-01 | P1114-02 | P1114-03 |
|----------------------------|----------|----------|----------|
| 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 E5 | 20 ml | 100 ml | 500 ml |
| Buffer PEV2* | 6 ml | 20 ml | 100 ml |
| Elution Buffer (Endo-Free) | 10 ml | 30 ml | 125 ml |
| Buffer ER2 | 1.8 ml | 5 ml | 15 ml |
| Clear Maxi Syringe | 2 | 10 | 50 |
| HiPure EF Maxi Column | 2 | 10 | 50 |
| 50ml 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℃。

准备事项

- 加入 0.5ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中,吸打混匀溶解 RNase A,然后全部转移至 Buffer E1 中,若 RNase A 是液体的,短暂离心后转移至 Buffer E1 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 PEW2,于室温保存。
- 低温下,Buffer E2 和 Buffer E4 有沉淀析出,于 55℃温水浴溶解。
- 本产品必须用水平桶状离心机,不能用角度离心机。

实验步骤: 转染级质粒 DNA 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◆0.5L 培养瓶加入 100~200ml LB/抗生素培养液;或在■2L 培养瓶中加入 200~300ml LB/抗生素培养液,接种 0.001 倍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 × 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。纯化大柱最大结合力为 3mg,用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。

3. 4,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集◆100~200ml 或■200~300ml 菌液,倒弃培养基,在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入◆8ml 或■10ml Buffer E1/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◆8ml 或■10ml Buffer E2 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。混匀后溶液应变得黏稠而透亮。当菌液用量达 300ml 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,形成均一无团块透光的裂解液,总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 加入◆8ml 或■10ml Buffer E3 至裂解液，稍快速上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液。4,000~5,000rpm 离心 10 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少的团块，让 Buffer E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。
7. 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 离心管中。
8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4，颠倒 10~15 次，按离心步骤或抽滤步骤操作。

离心方案

9. 将 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，转移不超过 20ml 混合液至柱子中，4,000~5,000rpm 离心 2 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。
10. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9ml Buffer E5，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9ml Buffer PEW2，4,000~5,000rpm 离心 10 分钟。
12. 取出柱子，60~65°C 烘干柱子 10 分钟，倒弃收集管中的废液，晾干收集管备用。
Buffer PW2 和无水乙醇起灭菌作用，倒弃滤液干燥后，收集管可用于质粒 DNA 的收集。
13. 把 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 3 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 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。
14. 加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20°C 保存。

抽滤操作

9. 把 HiPure EF Maxi Column 插到真空抽滤盒中，加入~20ml 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 E5 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. 把 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 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 ml Elution Buffer (Endo Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20℃ 保存。

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 1.9ml，然后加入 0.1ml Buffer E1/RNase 混匀，把 DNA 分成两份，每份 1.0ml 至 1.5ml 离心管中，静置 10 分钟消化残留 RNA。
2. 每管加入 110μl Buffer E3 和 110μl Buffer ER2，颠倒混匀 10~15 次，冰上（或 2-8℃ 冰箱）放置 10 分钟，42~55℃ 温育 5 分钟沉淀内毒素形成浑浊液。
低温下，Buffer ER2 溶于水并与内毒素分子结合。超过 15℃ 时，Buffer ER2 和内毒素会形成液滴状液泡结构并不溶于水，可以通过离心去除。
3. 室温下，13,000 x g 离心 10 分钟，转移上层上清液至新的离心管中。
4. 转移上清液至 2.0 ml 离心管中，加入 0.7 倍体积的异丙醇，颠倒混匀 10 次，室温放置 10 分钟，13,000 x g 离心 10 分钟。
5. 小心倒弃上清液，加入 1.0 ml 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，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 10min。
7. 加入适量的 Elution Buffer(Endo Free)至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解，把两管质粒合并成一管，保存于-20℃。