

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 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 分

产 品 编 号	P1156-01B	P1156-02B	P1156-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	100 μ l	10 mg	50 mg
Buffer P1	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer P2	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer NS3	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer ER2	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GWP	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer EVB	12 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
Clear Maxi Syringe	2	10	50
黄色大柱 C7	2	10	50
50ml Collection Tube C	2	10	50

版本：202601

P1156-03B 装盒备注：A 盒：试剂+酶 B 盒：30ml 针筒 C 盒：黄色大柱+离心管

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。
- 按瓶子标签所示,加入适量的乙醇稀释 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 5-10 ml 培养管中,37℃摇床培养 6~8 小时扩增菌液。

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 0.5~1L 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 12~16 小时,8,000rpm 离心 5 分钟,收集 100~200ml 菌液。

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,则生物量最高为 600. 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。YT/TB 培养液培养后,OD600=10,则菌液量为 50~75ml。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. 倒弃培养基,在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液,加入 8 ml 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。

4. 加入 8 ml Buffer P2 至重悬液,颠倒混匀 10~15 次,室温静置 2~3 分钟,其间颠倒混匀 3~5 次直至充分裂解。

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。

5. 加入 8 ml Buffer NS3 至裂解液中，立即颠倒 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 5 分钟。

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 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小的团块，让 Buffer NS3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

6. 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。
7. 测量滤液体积，加入 0.1 倍滤液体积的 Buffer ER2，颠倒 10-15 次，再加入 1/3 倍滤液体积的异丙醇，颠倒混匀 10~15 次。

8. 将纯化大柱 C7 套在收集管中，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 8~12 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 7 步），清洗液 GWP, EWB 和清洗液 PW2 至柱子抽滤，第 12 步抽滤完毕后，再加入 5ml 无水乙醇至柱子中抽滤，滤完后再抽滤 15 分钟干燥柱子的滤膜，按第 14 步进行洗脱。

9. 转移~11ml 混合液(分 3 次)至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管中，重复这一步至混合液都转移至柱子并离心。

纯化柱的最大容积为 13 ml，需要分 3 次过柱。

10. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 5 ml Buffer GWP 至柱子，静置 2 分钟，8,000rpm 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 5 ml Buffer EWB 至柱子，8,000rpm 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管中，加入 9 ml Buffer PW2(无水乙醇稀释)至柱子，8,000rpm 离心 10 分钟。
13. 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。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(PV2)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 14 步收集质粒。

14. 把柱子套在收集管 C 中，加入 1.0 ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。

这一步可洗脱出 60-75% DNA，若需最高浓度，省略第 15 步的二次洗脱或两次洗脱分开。

15. 加入 0.7 ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子膜中央，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。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/ug DNA)

1. 取质粒 DNA 至 2.0ml 离心管中，加入 0.1 倍 Buffer NS3 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。

低温 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 分钟形成浑浊液后再按第三步进行离心。

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。

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 分钟让质粒充分溶解。