

HiPure Plasmid EF 96 Kit

无内96孔质粒试剂盒

产品简介

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从1~5ml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30μg，内毒素含量<1EU/μg，浓度高达1μg/μl，可直接用于细胞转染和部分动物注射等。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。

产品组份

Cat.No.	P1157-01	P1157-02	P1157-03
Package	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
RNase A *	5 mg	20 mg	2 x 30 mg
Buffer P1	33 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer P2	33 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer LEN3	20 ml	60 ml	300 ml
Buffer LN4	60 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer PW1	60 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer PW2	50 ml	3 x 50 ml	6 x 100 ml
Elution Buffer	20 ml	90 ml	300 ml
Clear Plate	1	4	20
HiPure DNA Plate	1	4	20
2.2 ml Collection Plate	1	4	20
0.8ml Collection Plate	1	4	20

版本号：202401

保存条件

本产品在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)置于-20~-8℃。低温下，Buffer P2和Buffer LN4可能会有沉淀形成，使用前 37℃水浴使沉淀完全溶解。

准备条件

- 加入0.5~1ml Buffer P1至RNase A干粉中，吸打混匀3~5次让RNase A干粉充分溶解，把RNase A全部转移至Buffer P1中，于-2~8℃保存。
- 按瓶子标签所示，加入无水乙醇至Buffer PW2瓶子中于室温保存。
- 桶状水平式离心机，离心力大于3,000 × g。
- 可通气封口膜 (用于细菌培养)
- 不通气封口膜 (用于裂解和中和)
- LB培养基(1升, pH7.0): 10g蛋白胨, 5g酵母提取物, 10 g氯化钠

实验步骤

1. **96孔板培养：**在2.2ml深孔板(自备)，每孔加入1.3ml 2 × YT或LB培养液，接种单克隆菌斑，贴上透气封口膜，37℃，220~280rpm摇床培养20~24小时扩增质粒。
24孔板培养：在24孔深孔板(自备)，每孔加入5.0ml LB培养液，接种单克隆菌斑，贴上透气封口膜，37℃，220~280rpm摇床培养16~20小时扩增质粒。
2. 3,000~4,000 × g离心10分钟收集菌体，撕弃封口膜，倒弃培养液，把96孔板反扣于吸水纸上，轻轻拍打几下以吸尽残液。
3. 每孔中加入260μl Buffer P1/RNase A混和液，**最高速度涡旋或吸打重悬细菌。**
使用前，须确保RNase A已加到Buffer P1中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。若用移液工作站或板式涡旋仪(如IKA MS3)等，最高速度涡旋3-5分钟或直至菌体充分重悬。24孔培养时，重悬后把4个24孔板的重悬液合并至96孔板。
4. 每孔中加入260μl Buffer P2，贴上封口膜，上下颠倒混匀6~8次，室温放置3分钟，其间颠倒

混匀数次，短暂离心收集孔口的液滴。

若用移液工作站或板式涡旋仪时（IKA MS3）等，300~600rpm低速振荡3~5分钟。当菌液用量达5ml时，裂解液会极为粘稠，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，并轻稍振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过5分钟。

5. 撕去封口膜，每孔加入130 μ l Buffer LEN3，贴上封口膜，立即温和地上下颠倒混匀10-15次。

若用移液工作站或96孔板涡旋仪时（IKA MS3）等，300~600rpm低速振荡5分钟。当菌液用量达5ml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。

6. 3,000~4,000 $\times$ g 离心10分钟。

离心操作

7. 取Clear Plate放置于2.2ml Collection Plate，转移~0.6ml上清液(第6步)转移至Clear Plate中，3,000 $\times$ g 离心3分钟。

转移沉淀物不会影响过滤效果。

8. 丢弃Clear Plate，加入500 μ l Buffer LN4至滤液中，贴上封口膜，颠倒混匀6-8次。

9. 取HiPure DNA Plate放置于2.2ml Collection Plate，转移混合液至HiPure DNA Plate中，3,000 $\times$ g 离心3分钟。

10. 倒弃滤液把结合板放回收集板，每孔加入500 μ l Buffer PW1。3,000 $\times$ g 离心3分钟。

11. 倒弃滤液把结合板放回收集板，每孔加入750 μ l Buffer PW2。3,000 $\times$ g 离心3分钟。

12. 倒弃滤液把结合板放回收集板，每孔加入750 μ l Buffer PW2。3,000 $\times$ g 离心3分钟。

13. 倒弃滤液，把结合板放回收集板上，最大速度(~4,500 $\times$ g) 离心10分钟。

14. (可选) 取出结合板放置于50~55 $^{\circ}$ C烘箱干燥10分钟。

15. 取下结合板放置于0.5ml Collection Plate上，每孔加入80~100 μ l Elution Buffer或灭菌水至膜中央,放置2分钟，最大速度(~4,500 $\times$ g)离心5分钟。取出洗脱板贴上封口膜，把质粒保存于4 $^{\circ}$ C

或-20℃。

负压抽滤操作

7. 把2.2ml Collection Plate放在真空抽滤盒的底部的内槽中。
8. 把Clear Plate放在上盖的内槽中，调整Clear Plate的位置，使出口插到2.2ml Collection Plate 对应的孔中。
9. 把第6步的上清液(~0.55ml)转移至Clear Plate中，打开真空泵，抽滤3分钟。
转移沉淀物不影响过滤效果。抽滤时用手稍压Clear Plate，当压力开始上升后，松开手。此时压力会缓慢上升到一定压力，溶液会过滤到1.6ml收集板中。
10. 关闭真空泵，当压力降至零时。丢弃Clear Plate，移开抽滤盒的上盖。
16. 丢弃Clear Plate，加入500µl Buffer LN4至滤液中，贴上封口膜，颠倒混匀6-8次。
11. 把HiPure DNA Plate放在抽滤盒的上盖内槽中，把一半混合液转移至HiPure DNA Plate中。打开真空泵，抽滤1~2分钟，继续转移混合液至HiPure DNA Plate中，直到全部抽滤完毕。
12. 关闭真空泵，当压力降至零度时，每孔中加入500µl Buffer PW1，抽滤2分钟。
13. 关闭真空泵，当压力降至零度时，每孔中加入750µl Buffer PW2，抽滤2分钟，再加入750µl Buffer PW2，抽滤5分钟。关闭真空泵，当压力降至零度时，取下结合板，在一叠吸水纸上用力垂直拍打7-8次使孔壁的液滴流出。
14. 把结合板重新放回抽滤盒中。打开真空泵，继续抽滤10分钟。
15. (可选)取出结合板放置于55℃烘箱，干燥10分钟。
16. 把800µl收集板放在抽滤盒的内槽中，盖上抽滤盒的上盖，调整结合板的位置，使之结合板底部的每个突出部分都插入收集板。
17. 加入100~150µl Elution Buffer或灭菌水至结合板的膜中央，静置2分钟。打开真空泵抽滤3分钟，关闭真空泵。
18. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于4℃或-20℃。