

HiPure Plasmid EF Mega Kit

低内质粒超大量试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 0.5~0.7L 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 2μg/μl，可直接用于细胞转染和动物注射等。70 分钟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

Cat.No.	P1116-01	P1116-02	P1116-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	30 mg	2 x 60 mg
Buffer E1	42 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E2	42 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E3	42 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E4	42 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E5	22 ml	110 ml	550 ml
Buffer PEW2*	10 ml	50 ml	2 x 100 ml
Elution Buffer (Endo Free)	10 ml	60 ml	200 ml
Buffer ERS1	1.5 ml	10 ml	40 ml
Buffer ERS2	1.5 ml	10 ml	40 ml
Clear Mega Syringe	2	10	50
红色大柱 E6	2	10	50
50ml 离心管（带垫片）	2	10	50
5ml 尖底离心管	2	10	50

保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)放置于 -20~8℃。低温下，Buffer E2/E4 会有沉淀形成，55℃水浴使沉淀完全溶解。

实验步骤 :转级染质粒 DNA 提取

- 加入 0.5ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中,吸打混匀让 RNase A 干粉充分溶解,然后把 RNase A 全部转移至 Buffer E1 中,于 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 瓶子中于室温保存。

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 3L 培养瓶中加入 500~700ml 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。生物量为 1500,若 YT/TB 培养液培养后,OD600=10,则高拷贝菌液量为 250ml。

3. 转移培养液至合适的离心管中, 8,000 × g 离心 10 分钟收集 500~700ml 菌液。

采用水平离心机, 4000~5000rpm 离心 15 分钟。

4. 倒弃培养基,在吸水纸上轻轻拍打吸尽残液,加入 20 ml Buffer E1/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。

5. 加入 20 ml Buffer E2,颠倒混匀 10~15 次,室温放置 3~5 分钟,其间颠倒混匀数次直至完全裂解。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后,整个溶液变成均一的溶液而且透亮。当菌液用量达 500~700ml 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 20 ml Buffer E3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状的悬浊液，8,000 × g 离心 10 分钟。

加入 Buffer E3 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 500ml 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 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，选择离心或抽滤进行操作。

离心操作过柱

9. 将红色大柱 E6 套在 50ml 收集管，转移不超过 16ml 混合液至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟。倒弃滤液把柱子套回收集管，并重复把混合液转移至柱子中离心过滤。

第 9~16 步可以用水平桶装离心机，把离心速度调至最高(5000rpm)离心 2~3 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10 ml Buffer E5，8,000rpm 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10 ml Buffer PEW2，8,000rpm 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10 ml Buffer PEW2，8,000rpm 离心 10 分钟。
13. 取出柱子，60~65℃ 烘干 10 分钟干燥滤膜，倒弃收集管废液并反扣于吸水纸吸尽残液晾干，按第 14 步进行洗脱。

采用水平离心机，速度调整至最高(>5000rpm)离心 10 分钟干燥柱子。

抽滤操作过柱

9. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把红色大柱 E6 插到真空抽滤盒的接口处。
10. 倒入<16 ml 混合液(第 8 步)柱子中，打开真空泵进行抽滤，及时倒入混合液(不要空抽)至柱子中抽滤，直到所有混合液都从柱子过滤完毕，关闭真空泵。

及时倒入混合液不要让柱子空抽，空抽时会产生大量气泡堵塞滤膜造成抽滤速度变慢。

11. 加入 10ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤 3 分钟，抽滤完毕后关闭。
12. 加入 10ml Buffer PEW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，再加入 10ml Buffer PEW2 进行抽滤。
13. 加入 5ml 无水乙醇至柱子中进行抽滤，滤完后继续 15~20 分钟干燥柱子。

洗脱 DNA

14. 在 50ml 收集管中放入一个 5ml 尖底离心管，红色大柱 E6 插入 50ml 收集管，柱子底部孔口插入 5ml 尖底离心管中。
15. 加入 1.5ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子滤膜中，静置 2 分钟，8,000rpm 离心 3 分钟。
这一步可洗脱出 60-70% DNA，若需最高浓度，省略第 16 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
16. 加入 1.5ml Elution Buffer (Endo-Free)至柱子滤膜中，静置 2 分钟，8,000rpm 离心 3 分钟。
弃置柱子，取出 5ml 离心管中，把质粒 DNA 保存于-20℃或待用。
 - 由于滤膜存在吸水性，~0.3ml 洗脱液损失，每次洗脱用量不要低于 1000ul，并进行两次洗脱。
 - 低拷贝载体或富含 RNA 菌种，质粒 DNA 中可能会含有 RNA 污染，OD260 吸光值升高，造成质粒 OD 浓度与电泳亮度不符合，用电泳校准核酸浓度后使用或用附加流程，异丙醇重沉淀去除 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。

附加流程：无内毒素质粒 DNA (0.1EU/μg)

1. 取质粒 DNA (第 16 步)，加入 Buffer E1/RNase A 至总体积 3.0 ml，混匀，静置 10 分钟。
2. 加入 0.6 ml Buffer ERS1，颠倒混匀 10-15 次，静置 10 分钟，其间颠倒混匀数次。
3. 加入 0.6 ml Buffer ERS2，颠倒混匀 10-15 次形成浑浊液，室温 10000 rpm 离心 10 min。
若柱子未充分干燥，混匀后不能变成浑浊液，再加入 0.3ml Buffer ERS2 混匀以形成浑浊液。离心后若上清液仍是浑浊的，重复离心步骤并调整离心机的降速参数为最慢下降速度。若离心机无调降速参数，把混合液转移至数个 2.0ml 离心管中，室温 13000 rpm 离心 10 min。
4. 转移上清液至合适的离心管中，加入 0.7 倍上清液体积的异丙醇，颠倒混匀 10-15 次，室温静置 10 min，10,000~13,000 rpm 离心 15min 沉淀质粒 DNA。
更方便操作时，把混合液分装至数个 2ml 离心管中，在台式高速离心机中操作。
5. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 75%乙醇，涡旋 5 秒，10,000~13,000 rpm 离心 3 min。
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. 加入适量灭菌水，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。