

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。

产品组份

产品编号	P1114-01	P1114-02	P1114-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	30 mg	100 mg
Buffer E1	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer E2	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer E3	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer E4	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer E5	25 ml	120 ml	550 ml
Buffer PEW2*	20 ml	25 ml	2 x 100 ml
Buffer TE	15 ml	30 ml	120 ml
Buffer ATL	5 ml	20 ml	100 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
HiPure EF Maxi Column	2	10	50
50ml Collection Tube	2	10	50

版本号：202401

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 $-20\sim-8^{\circ}\text{C}$ 。低温下，Buffer E2/E4 会有沉淀形成， $37\sim55^{\circ}\text{C}$ 水浴使沉淀完全溶解。

准备事项

- 加入~0.5ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，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，于室温保存。
- 低温下，Buffer E4 有沉淀析出，于 55℃ 温浴溶解。

实验步骤

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 100~150ml 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 12-14 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◆100~150ml 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◆7ml 或■10ml Buffer E1/RNase A 混和液，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◆7ml 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 2 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。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。当菌液用量达 300ml 时，裂解液会极为粘稠，属于高密度破裂解类型，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍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◆7ml 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，并稍稍振荡让大块沉块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(Clear Midi Syringe)活塞，把第 6 步的上清液倒入过滤器中，把活塞插入过滤器，推动活塞使中和液过滤到 50ml 离心管中。

上清液体积超过 20ml，先转移 20ml 进行过滤，然后缓慢取出活塞，把余下上清转移至注射器进行过滤。若拔出活塞时，内环或滤膜有轻动时，再推入活塞压紧内环和滤膜，然后慢慢地慢慢地拔出活塞，不要让滤膜和内环松动。

8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液中，颠倒混匀 6~8 次。

9. 将 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管，转移不超过 20ml 混合液至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，把剩余混合液转移至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。重复此步直至所有混合液都转移至柱子中离心过滤。

11. 根据下游应用，选择合适的流程：转染级质粒流程或无内毒素质粒流程进行操作。

转染级质粒提取流程

12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 10ml Buffer E5，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

13. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10ml Buffer PEW2，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

14. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 5ml 无水乙醇，4,000~5,000rpm 离心 10 分钟。

15. 取出柱子，60°C 烘箱中放置 10 分钟干燥柱子。倒弃收集管中的废液，晾干备用。

滤液 (Buffer PW2) 含 80%乙醇和无水乙醇可以起用浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，50ml 收集管中可以用于第 16 步的质粒 DNA 收集。

16. 把 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，加入 1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央。静置 3 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
17. 再加入 0.5~1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央。静置 3 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

由于滤膜存在吸水性且离心速度转低，约有 0.4~0.5ml 洗脱液损失，进行第二次洗脱能有效洗脱出余下的质粒 DNA。处理低拷贝载体，建议第一次加入 1.5ml 洗脱液离心，第二次再加入 0.5ml 新洗脱液，最后可以得到~1.5ml 洗脱液。处理低拷贝载体或富含 RNA 菌种，质粒 DNA 可能会含有短片段 RNA，会造成 OD260 吸光值很高，质粒 OD 浓度与电泳亮度不符合。用电泳校准核酸浓度后再使用或用低内毒素质粒提到流程进一步纯化去除短片段 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。取质粒 DNA，用 Buffer E1/RNase A 补足 2.5ml，加入 0.5ml Buffer E3，混匀。加入 2.1ml 异丙醇，颠倒混匀 10-15 次，按低内毒素质粒的第 17~20 步进行操作。

低内毒素质粒和低拷贝数流程

12. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10ml Buffer E5。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
13. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 2.5ml Buffer ATL，静置 1 分钟。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟，把柱子装在新的 50ml 收集管(自配)中备用。
14. 涡旋混匀 10 秒让滤液混匀，加入 0.5ml Buffer E3 至滤液，涡旋 15 秒，冰上放置 10 分钟。
15. 把混合液倒入至柱子中，4,000~5,000rpm 离心 5 分钟过滤去除 SDS/钾/内毒素沉淀。
16. 丢弃柱子，加入 2.1ml 异丙醇至滤液中，涡旋混匀 10 秒。
17. 把混合液转移至 3 个 2.0ml 离心管中，每一管约为 1.7ml。4°C，1,3000 × g 离心 10 分钟沉淀质粒 DNA。
18. 倒弃上清液，每管加入 1ml 80%乙醇，涡旋 5 秒。4°C，1,3000 × g 离心 5 分钟。
19. 倒弃上清液，短暂离心后吸弃所有残液，空气干燥 5 分钟。
20. 加入 0.1~0.15ml 灭菌水，涡旋混匀 5 秒，放置 10 分钟并振荡数次让质粒充分溶解。把三管质粒合并在一管，把质粒保存于-20°C。