

HiPure Plasmid EF Midi Kit

去内毒素质粒中提试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术, 适合于从 30~50ml 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 0.5mg, 内毒素含量 < 1EU/ μ g, 浓度高达 1 μ g/ μ l, 可直接用于细胞转染和动物注射等。40 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。

产品组份

产品编号	P1113-01	P1113-02	P1113-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	60 mg
Buffer E1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E3	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E4	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E5	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PW1	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer PW2*	3 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	30 ml
Clear Midi Syringe	2	10	50
HiPure EF Midi Column	2	10	50
1.5 ml Collection Tubes	2	10	50

版本号: 2019-01

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 $^{\circ}$ C。低温下保存, Buffer P2/E4 会有沉淀形成, 55 $^{\circ}$ 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°C 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 PW2，于室温保存。
- 灭菌的 15ml 离心管，用于收集 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 低温下，Buffer E4 有沉淀析出，于 55°C 温浴溶解。

实验步骤（高拷贝数方案）

1. 将含目的质粒的菌种接种于含有 1 ml LB/抗生素培养基的 10ml 培养管中，37°C 摇床培养 6~8 小时少量扩增菌液。

不要用 TB 或 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。菌种保存过程中存在质粒丢失现象，甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线活化后，挑取单菌落进行少量扩增，不要直接用甘油保藏菌种进行小扩培养。培养瓶或培养管的体积必须大于或等于培养液体积的 4 倍。

2. 在 0.2~0.3L 培养瓶中加入 30~50ml 含抗生素 LB 培养液，接种 0.1% 初级菌液至培养瓶中，37°C 摇床培养 14~16 小时扩增菌液。

不要用 TB 或 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。

3. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 30~50ml 菌液。

4. **倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。加入 2.5ml Buffer E1/RNase A，高速涡旋重悬细菌。**

彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。RNase A 可以预先加入 Buffer E1 中，该混合液可在 2-8°C 保存 6 个月。

5. **涡旋 5 秒重悬细菌，加入 2.5 ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。室温放置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀 2~3 次。**

轻轻颠倒混匀，不要涡旋。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。处理多个样品时，总操作时间不要超过 4 分钟。

6. **加入 2.5 ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 10~15 次或直至样品充分混匀。**

加入 Buffer E3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。菌液用量较多时，中和也会较难进行，中和时需要稍用力颠倒数次至溶液彻底中和。

7. 3,000~5,000 × g 离心 5~10 分钟。

8. **取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第七步的上清倒入过滤器中。**把过滤器的出水口对准已准备好的 50ml 离心管。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 50ml 离心管中。

为了监控 DNA 的得率，取 0.3ml 上清液至新的离心管，加入 90ul 异丙醇混匀，转移至 DNA 结合柱(质粒小提试剂盒)进行离心过柱，按小提试剂盒进行洗涤和洗脱，计算出 DNA 的得率，若产量低于 4ug，属于低拷贝数，按低拷贝载体处理操作，即第 9 步加入 1/4 体积的 Buffer E4，第 12 步改为 Buffer PW1 清洗。

9. 测量滤液体积，**加入 1/4 倍体积 Buffer E4(~2.2 ml)至滤液中**，颠倒混匀 6-8 次。

这一步的温度必须控制在 15~30°C，低于 15 度时，DNA 的得率会降低。

10. **将 HiPure EF Midi Column 套在 15ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**3,000 × g 离心 2 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**把剩余混合液转移至柱子中。**3,000 × g 离心 2 分钟。

12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 4ml Buffer E5 至柱子中。**3,000 × g 离心 2 分钟。

处理低拷贝数载体，这一步把 4ml Buffer E5 改为 1ml Buffer PW1，有利于减少 RNase 污染。由于 Buffer PW1 会洗去超载的质粒，使用 Buffer PW1 时清洗时，最高产量不超过 150ug。由于中低拷贝载体产量一般也在 150ug 左右，所以用 Buffer PW1 清洗不会对产量带来明显的影响。

13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 4ml Buffer PW2 至柱子中。**3,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

为确保彻底去除乙醇，建议取吸附柱，室温放置 10~15 分钟晾干吸附膜。

14. **把柱子套在灭菌的 15ml 离心管中(自备)。**加入 0.3~0.5ml Buffer TE 至柱子膜中央。静置 2 分钟。3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。

15. **把洗脱液重新转移至柱子膜中央**，3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20°C。

本产品处理低拷贝数载体时容易出现 RNA 污染，建议用异丙醇浓缩步骤去除 RNA 污染，或用低拷贝数方案进行提取，可以减少 RNA 污染。

常见问题

1. DNA 产量低

- **质粒拷贝数:** 载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2~3 倍的产量波动, (每毫升培养过夜的菌液, 高拷贝数的质粒载体产量为 4~16 μ g)。长片段质粒(>8KB)和表达型载体常以中低拷贝数为主, 每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μ g。
- **菌种问题:** 菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 养菌前最好先划线活化, 以稳定产量。
- **细胞未充分裂解:** 细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬, 成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **低温离心:** 加入 Buffer E4 后, 不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** Buffer E4 不能低温放置, Buffer P2/E4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer E4 体积:** Buffer E4 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer E4 会导致产量的波动。
- **低拷贝数和长片段载体:** 本产品对低拷贝数和长片段的载体(>8KB)抽提效率较低, 建议使用 magen 公司的 HiPure Plasmid/BAC EF Kits 进行抽提。
- **洗脱不充分:** 再加入 0.2ml Buffer TE 至柱子膜中央进行第三次洗脱。

2. RNA 污染

- **RNASE 的用量和保质期:** RNASE A 加入量为常规产品的 2 倍, 使用时 Buffer P1/RNase 不要与其产品交互使用。Buffer P1/RNase 保存时间不要超过 6 个月。
- **菌液培养时间:** 本产品对 RNA 污染较为敏感, 建议细菌培养时间为 16 小时, 以降低菌液中 RNA 的丰度。
- **去除 RNA 污染:** 处理某些菌液时, 得到的质粒可能存在 RNA 污染, 通过醇类重沉淀可以去除 RNA。简易沉淀流程: 加入 0.1 倍体积 3M 醋酸钠(pH5.5)和 0.7 倍体积的异丙醇至质粒溶液中, 混匀后高速离心沉淀收集 DNA, 用 70%乙醇洗涤除盐, 空气干燥加入灭菌水溶解。详细可参照分子克隆等。