

HiPure Plasmid EF Maxi Kit B

无内毒素质粒大提试剂盒

本产品适合于从 100~150ml 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。

产品组份

产品编号	P1156-01B	P1156-02B	P1156-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	15 mg	50 mg
Buffer P1	20 ml	100 ml	450 ml
Buffer P2	20 ml	100 ml	450 ml
Buffer LN3	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer ER2	6 ml	25 ml	120 ml
Buffer PW1	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer EWB	12 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer CL(平衡液 CL)	6 ml	30 ml	150 ml
HiPure DNA Maxi Column D	2	10	50
50ml Collection Tube C	2	10	50

版本：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~-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 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，然后把 RNase A 全部转移至 Buffer P1 中，于 2-8℃ 保存，有效期为 6 个月。
- 按瓶子标签所示，加入适量的乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

实验步骤

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 小时扩增菌液。**
培养方法：在无茵条件下，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 0.5~1L 培养瓶中加入 100~150ml 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 3 分钟，收集 100~150ml 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。2 × 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。高拷贝生物量为 450，低拷贝生物量 900。若 YT/TB 培养液培养后，OD600=10，则高拷贝菌液量为 45ml，低拷贝菌液用量 90ml。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 混和液至菌体中，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 3~5 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，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。当菌液用量达 150ml 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，并稍稍振荡让菌体充分裂解，总裂解时间不要超过 5 分钟。

5. **加入 4 ml Buffer LN3 至裂解液中，立即颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状的悬浊液，8,000rpm 离心 15 分钟。**

加入 Buffer LN3 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 150ml 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淀团分散成较小的团块，让 Buffer LN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

6. **转移上清液至新的离心管中，加入 0.1 倍体积 Buffer ER2，颠倒混匀 10-15 次，冰上放置 10 分钟，其间颠倒混匀数次。室温下 (>20°C)，8,000 rpm 离心 15 分钟。**

超过 20°C 时，Buffer ER2 与内毒素结合在一起形成液泡结构不溶于水，在离心后在离心管底部分层成红色溶液层。若离心后若没有形成分层，颠倒 5-6 次，37-50°C 温育 3-5 次，再重复离心步骤，并确保离心机处于室温或已完全恢复室温，取出离心管时，轻轻取出。Buffer ER2 与内毒素分子形成的液滴密度只稍高于上清液，很容易受外力因素影响分层，调整离心机的降速参数至缓慢或最慢，有利于分层。若离心后有少量液滴悬浮在上清液中，静置 3-5 分钟后使之沉淀后再转移上清液。转移少量的 ER2 液滴不影响 DNA 产量。

7. **转移上清液至新的离心管中，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀 6-8 次。**

8. **将 HiPure DNA Maxi Column D 套在收集管中，转移 2.5ml Buffer CL (平衡液)至柱子中，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。**

9. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。转移 10~15ml 混合液(第 8 步)至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**

纯化柱的最大容积为 15 ml，需要分 2~3 次过柱。若离心机转子倾角较大，建议加入不超过 10 ml，以防产生漏液现象。

10. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。重复第 9 步至混合液都转移至柱子并离心。**

11. **倒弃滤液把柱子套回收集管中。加入 5 ml Buffer PW1 至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**

12. **倒弃滤液把柱子套回收集管中。加入 5 ml Buffer EVB 至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**

13. **倒弃滤液把柱子套回收集管中。加入 8 ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。**

8,000rpm 离心 10 分钟。

14. 取出吸附柱，打开盖子，室温干燥 10 分钟。倒弃收集管的全部液体，晾干备用。
15. 把柱子套在收集管 C 中，加入 0.8~1.0ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 3 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，-20℃ 保存。
 - 为了增加质粒的回收效率，建议将得到的质粒溶液重新加入吸附柱中，进行第二次洗脱。由于滤膜存在吸水性，会有~0.15ml 洗脱液损失，洗脱体积不建议低于 0.7ml。
 - 这一步得到的质粒 DNA 可以直接用于细胞转染。由于 Elution Buffer 不含防腐剂，建议用新配制的灭菌水代替，以防止微生物感染。质粒 DNA 用于用于动物注射或敏感细胞转染，建议用附加流程用 Buffer ER2 (Triton X-114) 抽提进一步降低内毒素水平，然后再用于动物注射和高敏转染。
 - 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附加流程进一步纯化去除短片段 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。

附加流程：进一步纯化质粒 DNA (注射级)

1. 取质粒 DNA (第 15 步) 至 2.0ml 离心管中，加入 0.1 倍 Buffer LN3，颠倒混匀。
为方便计算，若洗脱液不足 0.9ml，加入 Elution Buffer 补足至 0.9ml，然后加入 0.1ml Buffer LN3。
2. 加入 0.1 倍体积的 Buffer ER2，颠倒混匀数次，冰上 (或 2-8℃ 冰箱) 放置 10 分钟，其间颠倒数次。室温下，13,000rpm 离心 10min，转移上清液至新的离心管中。
离心后管底分层成红色液层。若离心后没有形成分层，再颠倒 5-6 次，重复离心步骤，并确保离心机已完全恢复至室温。若质粒用于动物注射或高敏应用，建议重复第 2 步两次以达到无内毒素级。
3. 加入 0.8 倍体积异丙醇，颠倒混匀 10-15 次。室温静置 5min，13,000rpm 离心 15min。
离心后，DNA 沉淀物有可能看不到，特别是处理中低拷贝数载体时，DNA 产量太少形成的沉淀更不可见。受离心机角度影响，部分 DNA 沉淀可能粘附的管壁上。若 DNA 沉淀粘附不紧，离心后取出离心管后再颠倒数次让沉淀从管壁上脱落，再重复离心步骤。
4. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 rpm 离心 3min。
5. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5min。
6. 加入适量灭菌水至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。