

HiPure Plasmid EF Concentrate Kit

无内质粒浓缩试剂盒

产品组份

产品编号	P1301-01	P1301-02	P1301-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
Buffer ERS1	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer PW2*	10 ml	10 ml	50 ml
DNA Concentrate Mini Column	10 个	50 个	250 个
2 ml Collection Tube	10 个	50 个	250 个

产品编号	P1302-01	P1302-02	P1302-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	50 ul	5 mg	10 mg
Buffer P1	10 ml	30 ml	100 ml
Buffer ERS1	15 ml	60 ml	250 ml
Buffer ERS2	15 ml	60 ml	250 ml
Buffer PW2*	10 ml	10 ml	50 ml
Extender Tubes	10 个	50 个	250 个
DNA Concentrate Mini Column	10 个	50 个	250 个
2 ml Collection Tube	10 个	50 个	250 个

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)置于-20~8℃。

产品简介

本产品采用小量浓缩柱，适合于从质粒DNA中进一步去除内毒素，去除RNA污染，并浓缩质粒DNA。

准备事项

- 加入0.2~0.5ml Buffer P1 至RNase A 干粉中，吸打5~10次让RNase A 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4倍体积的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。

方案1：离心方案（处理小于2ml的质粒DNA）

1. **转移质粒DNA至合适的离心管中。**
若质粒DNA含有RNA污染，加入0.1倍样品体积的重悬液/RNase A混匀，室温放置15-30分钟降解RNA，并按该总体积作为样品体积。
- 2 **调节盐离子浓度：**加入0.1倍样品体积的Buffer ERS2 混匀。
- 3 **沉淀质粒：**加入0.7倍样品体积的异丙醇，颠倒15~30次，室温放置10分钟。
- 4 **过滤捕获：**把DNA Concentrage Mini Column装在2ml收集管中，转移不超过0.75ml混合液至柱子中，10,000 × g离心1分钟。倒弃滤液把柱子放回收集管中，把余下的混合液再转移至柱子并离心，直到所有混合液都转移至柱子中。
- 5 **清洗除盐：**倒弃滤液把柱子放回收集管中，加入0.75ml 75%乙醇至针筒中，10,000 × g离心1分钟。
- 6 **干燥柱子：**倒弃滤液把柱子放回收集管中，10,000 × g离心1分钟甩干柱子。
- 7 **洗脱DNA：**把柱子装在2.0ml离心管中，加入0.1~0.3ml洗脱液至柱子中，静置2分钟，10,000 × g离心1分钟，把洗脱液再转移至针筒中，静置2分钟，盖上盖子，10,000 × g离心1分钟。
- 8 **弃去柱子，**把DNA转移至1.5ml离心管中保存。

方案2：负压抽滤浓缩(处理大于2ml的质粒DNA浓缩)

1. 转移质粒DNA至合适的离心管中。

若质粒DNA含有RNA污染，加入0.1倍样品体积的重悬液/RNase A混匀，室温放置15-30分钟降解RNA，并按该总体积作为样品体积。

- 2 调节盐离子浓度：加入0.1倍样品体积Buffer ERS1，颠倒混匀。

- 3 沉淀质粒：加入0.7倍体积异丙醇，颠倒15~30次，室温放置10分钟。

例：1ml质粒，需加入0.1ml Buffer P1/RNase，0.11ml Buffer ERS2和0.77ml异丙醇。

- 4 过滤捕获：把HiPure DNA Column插到真空抽滤盒接口处，把Extender Tubes插到柱子中。

- 5 过滤捕获：转移混合液（第四步）至Extender Tubes中，打开真空泵进行抽滤，继续把混合液转移至柱子进行抽滤，当液体全部过滤完毕后，关闭真空泵，让压力下降为零。

- 6 抽出Extender Tubes并弃去。

- 7 清洗除盐：加入900 μ l Buffer PW2至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当全部溶液过滤完毕后，继续抽滤10分钟干燥柱子。

- 8 洗脱DNA：把柱子套在灭菌的1.5ml 离心管中。加入50~300 μ l Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。静置2分钟，13,000 \times g 离心1分钟洗脱DNA。

洗脱体积取决于质粒DNA总量，建议把质粒最高浓度控制在1~2 μ g/ μ l以确保洗脱效率。

- 9 把洗脱液再转移至柱子中，静置2分钟，13,000 \times g 离心1分钟洗脱DNA。

方案3：进一步去除内毒素

1. 转移质粒DNA至合适的离心管中。

质粒总量<500ug: 用灭菌水或Elution Buffer将质粒稀释至1ml, 按离心方案进行操作。

质粒总量0.5~1mg: 用灭菌水或Elution Buffer将质粒稀释至2ml, 按离心或抽滤方案操作。

质粒总量1~2mg: 用灭菌水或Elution Buffer将质粒稀释至5ml, 按抽滤方案进行操作。

2 (可选) 加入0.1倍体积的Buffer P1/RNase, 混匀, 室温放置15~30分钟降解RNA。

若质粒DNA含RNA污染, 加入Buffer P1/RNase进行消化。

3 计算样品总体积, 加入0.2倍体积Buffer ERS1, 颠倒10~15次, 室温放置10分钟, 其间颠倒混匀数次让内毒素与ERS1充分结合。

4 加入0.2倍样品体积Buffer ERS2, 颠倒混匀10-15次沉淀内毒素, 形成浑浊溶液。

例: 1ml 质粒DNA, 加入0.1ml Buffer P1/RNase, 加入0.22ml ERS1和0.22ml ERS2.

5 室温下, 10,000 x g 离心5分钟。

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, 加速降速时管内液体会因振动让下层有机相悬浮而造成上层溶液浑浊。

6 转移上清液至新的离心管中, 加入0.7倍体积异丙醇, 颠倒15~30次, 按方案1或和方案2的过柱步骤(第4步)进行操作。