

## 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 0.5L 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。

### 产品组份

Cat.No.	P1116-01B	P1116-02B	P1116-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	30 mg	2 × 60 mg
Buffer E1	45 ml	220 ml	2 × 550 ml
Buffer E2	45 ml	220 ml	2 × 550 ml
Buffer E3	45 ml	220 ml	2 × 550 ml
Buffer E4	45 ml	220 ml	2 × 550 ml
Buffer E5	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer PEW2*	10 ml	25 ml	3 × 50 ml
Buffer TE	10 ml	40 ml	200 ml
Buffer ERS1	1.0 ml	10 ml	40 ml
Buffer ERS2	1.0 ml	10 ml	40 ml
Clear Maxi 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

- 加入 0.2~0.5ml Buffer E1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，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。
- 灭菌的 50ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养瓶

### 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 2.5L 培养瓶中加入 500ml 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。

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)，OD<sub>600</sub> 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。生物量为 1500，若 YT/TB 培养液培养后，OD<sub>600</sub>=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 3 分钟收集 500ml 菌液。

采用水平离心机，4000~5000rpm 离心 10 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。

### 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 500ml 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，并轻轻振荡让菌体充分裂解，总裂解时间不要超过 5 分钟。

- 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， $8,000 \times g$  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。

- 取出过滤器的活塞，把第 6 步的上清液全部倒入过滤器中，把过滤器的出水口对准离心管或合适大小的瓶子（自备）。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到合适容器中。
- 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

- 将红色大柱 E6 套在 50ml 收集管，转移 <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，把剩余混合液转移至柱子，8,000rpm 离心 1 分钟。重复此步直至混合液都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。
- 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。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 10 ml Buffer PEV2，8,000rpm 离心 1 分钟。
- 倒弃滤液把柱子套回收集管，8,000 rpm 离心 10 分钟甩干柱子的滤膜。  
采用水平离心机，速度调整至最高 (>5000rpm) 离心 10 分钟干燥柱子。
- 取出柱子，55°C 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。

#### 抽滤操作过柱

- 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。
- 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。
- 加入 10ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，抽滤完后关闭。
- 加入 10ml Buffer PEV2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，抽滤完后关闭。
- 加入 10ml 无水乙醇至柱子中，打开真空泵进行抽滤，抽滤完后继续 15 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，并让离心管底部对准离心管口。
15. 加入 1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子滤膜中，静置 2 分钟，8,000rpm 离心 3 分钟。
16. 加入 1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子滤膜中，静置 2 分钟，8,000rpm 离心 3 分钟。弃子柱子，取出 5ml 离心管中，把质粒 DNA 保存于-20°C 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，并进行两洗脱液。
  - 这一步得到的质粒 DNA 可以直接用于细胞转染。由于 Buffer TE 不含防腐剂，建议用新配制的灭菌水或把 Buffer TE 重新灭菌后使用，以防止微生物感染。质粒 DNA 用于动物注射或敏感细胞转染，建议用附加流程用 Buffer ERS1 (Triton X-114)和 Buffer ERS2 抽提进一步降低内毒素水平。
  - 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：进一步纯化质粒 DNA (内毒素 < 0.1EU/μg, 无 RNA 污染)

1. 取质粒 DNA (第 16 步)，加入 Buffer E1/RNase 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，室温放置 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 次形成浑浊液体，室温下，10000 rpm 离心 10 min。

受乙醇污染影响，混匀后溶液还是澄清时，再补加入 0.3ml Buffer ERS2 混匀形成浑浊液体。离心后若上清液仍是浑浊的，重复离心步骤并调整大型离心机的降速参数为最慢下降速度。离心机加速降速时管内液体会因振荡让下层有机相悬浮而造成上层溶液浑浊。
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 10 min 沉淀质粒 DNA。

转移 1.6-1.9ml 混合液至数个 2ml 离心管中，可以在台式小型高速离心机中操作。
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。