

HiPure Plasmid EF Maxi Kit B

无内毒素质粒大提试剂盒

本产品适合于从 100~200ml 细菌培养液中提取 100~1000 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	P1158-01B	P1158-02B	P1158-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	3 mg	10 mg	50 mg
Buffer P1	15 ml	80 ml	400 ml
Buffer P2	15 ml	80 ml	400 ml
Buffer NS3	15 ml	80 ml	400 ml
Buffer ERS4	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer LN4	30 ml	170 ml	2 x 400 ml
Buffer EWB	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer PW2	10 ml	50 ml	3 x100 ml
Elution Buffer	6 ml	30 ml	160 ml
Clear Maxi Syringe B	2	10	50
红色大柱 C7	2	10	50
5ml 尖底离心管	2	10	50
50ml 收集管（垫片）	2	10	50

版本：202601

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，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。

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 小时小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单克隆菌种接种于 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 0.5~1.0L 培养瓶中加入 100~200ml 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)，OD600 应该在 2.0-3.0。2 x 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 B30 最大结合力为 1000µg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 8,000rpm 离心 3 分钟，收集 100~200ml 菌液。
4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 7ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋或吸打重悬细菌。

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 7ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 10~15 次，室温静置 3 分钟，期间颠倒数次直至细菌完全裂解。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一透亮。当菌液用量达 200ml 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，并轻稍振荡让

菌体充分裂解，总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 加入 7ml Buffer NS3 至裂解液，立即颠倒 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状悬浊液，8,000rpm 离心 10 分钟。

加入 Buffer NS3 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，并稍振荡让大块沉淀团分散成较少的团块，让 Buffer LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 可选：转移上清液至新的离心管中，加入 0.2 倍体积的 Buffer ERS4，颠倒混匀 15-20 次，室温放置 5 分钟，-20°C 冰箱中放置 10 分钟沉淀内毒素形成浑浊的悬液。

提取转染级质粒 DNA，可以省略这一步。

8. 取出过滤器的活塞，把第 6 步的上清液或第 7 步的混合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。

9. 加入 0.6 倍滤液体积 Buffer LN4，颠倒 6~8 次，选择抽滤或离心方法进行过柱操作。

离心操作

10. 将红色大柱 C7 套在 50 ml 收集管中，转移 14~15ml 混合液(第 9 步)至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟。倒弃滤液，把柱子套回收集管中，把余下混合液转移至柱子并离心。

纯化柱的最大容积为 15ml，需要分 3 次过柱。受离心机角度影响，以及大量试剂反复过柱，柱子中表层滤膜会脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。第 10-12 步采用水平或桶装离心机时，5000rpm 离心 3 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 12 ml Buffer EWB 至柱子，8,000rpm 离心 1 分钟。

12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 12 ml Buffer PVW2 至柱子，8,000rpm 离心 1 分钟。

13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 12 ml Buffer PVW2 至柱子，8,000rpm 离心 1 分钟。

14. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，8,000rpm 离心 10 分钟甩干柱子的滤膜。

水平桶装离心机，速度调整至最高（>5000rpm）离心 15 分钟干燥柱子。

15. 取出红色大柱 C7，打开盖子，55 度烘干 10 分钟干燥柱子。

16. 倒弃收集管的全部液体，并在吸水纸拍打几次吸尽残液，晾干后放入一个新的 5.0ml 尖底离心管至收集管中。

17. 加入 1.5ml Elution Buffer 至柱子的滤膜上，放回收集管并柱子底部插到 5ml 离心管中，静置 2 分钟，10,000 rpm 离心 3 分钟。
18. 加入 1.0 ml Elution Buffer 至柱子的滤膜，静置 2 分钟，10,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，小心取出 5ml 离心管，-20℃保存或待用。
 - 由于滤膜存在吸水性，0.2~0.3ml 洗脱液损失，洗脱体积总体积不要低于 2000ul，提高离心速度可以减少洗脱损失。
 - 为了增加质粒的回收效率，建议进行第二次洗脱。
 - 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。

抽滤操作

10. 把红色大柱 C7 插到真空抽滤盒中。
11. 加入 15~17ml 混合液（第 9 步）至柱子，打开真空泵进行抽滤，继续倒入混合液至柱子中进行抽滤，当全部混合液过滤完毕，关闭真空泵，让压力归零。

过滤时，柱子中表层滤膜有少量脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。
12. 加入 12 ml Buffer EWB 至柱子，打开真空泵进行抽滤。
13. 当全部溶液过滤后，加入 12 ml Buffer PW2 至柱子，进行抽滤。
14. 当全部溶液过滤后，加入 12 ml Buffer PW2 至柱子，进行抽滤。
15. 当全部溶液过滤后，加入 5 ml 无水乙醇至柱子，进行抽滤，当溶液抽滤完毕后，再抽滤 15 分钟干燥柱子。
16. 放入一个新的 5.0ml 尖底离心管至 50ml 收集管中，加入 1.5 ml Elution Buffer 至柱子的滤膜上，放回收集管并柱子底部插到 5ml 离心管中，静置 3 分钟，10,000 rpm 离心 3 分钟。
17. 加入 1.0ml Elution Buffer 至柱子的滤膜，静置 3 分钟，10,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，小心取出 5ml 离心管，-20℃保存或待用。
 - 由于滤膜存在吸水性，0.2~0.3ml 洗脱液损失，洗脱体积总体积不要低于 2000ul，提高离心速度可以减少洗脱损失。
 - 为了增加质粒的回收效率，建议进行第二次洗脱。
 - 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。