

HiPure Plasmid EF 96 Kit

96 孔板低内毒素质粒抽提试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 1~5ml 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 50 μ g，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。60 分钟内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.	P1115-01	P1115-02	P1115-03
Package	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
RNase A *	300 μ l	900 μ l	2 x 3.0 ml
Buffer E1	40 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer E2	40 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer E3	40 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer EP4	40 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer E5	150 ml	270 ml	3 x 500 ml
Buffer PV2*	50 ml	3 x 50 ml	6 x 100 ml
Clear Plate	1	4	20
HiPure DNA Plate	1	4	20
2.2 ml Collection Plate	1	4	20

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，Buffer E2/E4 会有沉淀形成，55 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。

准备条件

- 短暂离心 RNase 酶管，把 RNase A 转移至 Buffer E1 瓶子于 2-8°C 保存
 - 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2 瓶子于室温保存
 - 灭菌的 0.5ml 96 孔板，用于收集洗脱 DNA
 - LB 培养液和 96 孔深孔板
 - 桶状水平式离心机，离心力大于 3,000 × g
 - 可通气封口膜(用于细菌培养)
 - 不透气封口膜(用于裂解和中和)
1. 在 96 深孔板中，加入 1-1.5 ml 2 × YT 或 TB 培养液，将含质粒的 E. coli 接种于每个孔中，贴上可透气的封口膜或盖上盖子。37°C，220rpm 摇床培养 20~24 小时扩增质粒；培养细菌时，也可以采用 LB 培养液。使用高营养的培养液(如 2 X YT)可获得更高的产量，因为细菌生长密度提升。处理低拷贝的质粒时，如 Cosmids，我们推荐使用 2 × YT 培养液。需要处理更多菌液时，可用 24 孔板培养 5ml 菌液。
 2. 2,000 × g 离心 10 分钟收集菌体。
 3. 撕弃封口膜，把培养液倒弃到废液瓶中，并把深孔板反扣于吸水纸上，轻轻上下拍打几下以吸尽残液。**每孔中加入 220µl Buffer E1/RNase A 混和液**，拍打并涡漩重悬细菌。使用前，必须确保 RNase A 已经加到 Buffer E1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。(建议使用 8 道 1ml 的移液枪来转移溶液)。
 4. **每孔中加入 220 µl Buffer E2，贴上不透气的封口膜**。轻轻颠倒混匀 6-8 次，室温静置 3 分钟。
混匀时，可快速颠倒混匀数次，或 300-600RPM 振荡混匀 5 分钟。Buffer E2 中含有 SDS，使用前检查 Buffer E2 中是否有沉淀形成。若有沉淀，可置于 37°C 溶解。这一步不能涡旋，涡旋会引起基因组 DNA 的污染。静置时间不要超过 4 分钟。
 5. **撕弃封口膜，每孔中加入 220µl Buffer E3**，贴上不透气的封口膜，轻轻混匀让溶液彻底中和。
混匀时，可快速颠倒混匀数次，或 300-600RPM 振荡混匀 5 分钟。
 6. **4,000 × g 离心 10 分钟**。然后按离心方案或负压抽流方案进行操作。

离心方案

7. 取一块新的 Clear Plate 放置于收集板上，把上清液转移至 Clear Plate 中。4,000 × g 离心 3 分钟。丢弃 Clear Plate。
8. 取一块新的 HiPure EF Plate 放在收集板上。
9. 加入 1/3 倍体积的 (~200µl) 的 Buffer EP4 至收集板的滤液中。用液移枪吸打 5-6 次，然后把全部混合液转移至结合板中，4,000 × g 离心 3 分钟；
10. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔加入 600 Buffer E5。3,000 × g 离心 3 分钟。

11. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔加入 600 μ l Buffer PW2，静置 2 分钟。
4,000 \times g 离心 3 分钟；
使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。
12. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔再加入 600 μ l Buffer PW2。4,000 \times g 离心 3 分钟；
13. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。最大速度(\sim 4,000 \times g) 离心 15 分钟；
14. 取下结合板放置于 500 μ l 或 1.2ml 收集板上。每孔加入 60 μ l 灭菌水至结合板的膜中央，室温放置 3 分钟。4,000 \times g 离心 5 分钟。
15. 每孔再加入 60 μ l 灭菌水至结合板的膜中央，室温放置 3 分钟。4,000 \times g 离心 5 分钟。
16. 弃去 96 孔板，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

负压抽滤方案

9. 连接好真空抽盒，96 孔过滤板放在抽滤盒的上盖内槽中。
10. 把第 6 步获得的上清液转移至过滤板的每一个孔中。打开真空泵，用手压住真空抽滤盒的上盖，当压力开始上升，松开手。抽滤 3 分钟；关闭真空泵。
11. 倒弃过滤板，取出收集板。取一块新的 HiPure EF Plate 放在抽滤盒的上盖内槽中。
12. 加入 1/3 倍体积的 (\sim 200 μ l) 的 Buffer EP4 至收集板的滤液中。用液移枪吸打 5-6 次，然后把全部混合液转移至结合板中。
13. 打开真空泵，用手压住真空抽滤盒的上盖，当压力开始上升，松开手。抽滤 3 分钟；关闭真空泵。
14. 当压力降至零度时，每孔中加入 600 μ l Buffer E5。打开真空泵，每孔中再加入 600 μ l Buffer E5。打开真空泵，用手压住真空抽滤盒，当压力开始上升时，松开手。抽滤 3 分钟。关闭真空泵。
15. 当压力降至零度时，每孔中加入 600 μ l Buffer PW2。打开真空泵，每孔中再加入 600 μ l Buffer PW2。打开真空泵，用手压住真空抽滤盒，当压力开始上升时，松开手。抽滤 3 分钟。关闭真空泵。
16. 关闭真空泵。当压力降至零度时，取下结合板。在一叠吸水纸上用力垂直拍打 7-8 次，使孔壁的液滴流出。
17. 把结合板重新放回抽滤盒中。打开真空泵，用手压住上盖，当压力上升至最高时，松开手。继续抽滤 15 分钟。随着抽滤时间的增加，压力会缓慢下降。
18. (可选)取出结合板放置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱，干燥 15 分钟。
19. 移开抽滤盒的上盖，倒弃废液槽中的液体。把废液槽放回抽滤盒中，并在其上部放置一块

500 μ l 收集板。盖上抽滤盒的上盖，调整结合板的位置，使之结合板底部的每个突出部分都插入收集板。

20. 每孔加入 50-100 μ l 灭菌水至结合板的膜中央，室温放置 3 分钟。打开真空泵抽滤 3 分钟。关闭真空抽滤盒。再加入 50-100 μ l 灭菌水至结合板的膜中央，室温放置 3 分钟。打开真空泵抽滤 3 分钟。关闭真空抽滤盒。

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 E1/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 EP4 后，不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** Buffer EP4 不能低温放置，Buffer E2/EP4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PVW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer EP4 体积:** Buffer EP4 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer EP4 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。
- **角度离心:** 由于 HiPure EF Maxi Column 柱子的内径较大，最好的桶状离心机。若无桶状离心机，可以真空抽滤过柱。
- **洗脱不充分:** 再加入 0.4ml 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 5 倍，使用时 Buffer E1/RNase 不要与其产品交互使用。Buffer E1/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 16~18 小时，以降低菌液中 RNA 的丰度。