

HiPure Plasmid EF Maxi Kit

去内毒素质粒大提试剂盒（通用型）

本产品适合于从 100~200ml 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 0.5EU/ μ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

产品组份

产品编号	P1156-01	P1156-02	P1156-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	60 mg	300 mg
Buffer P1	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer P2	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer LN3	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW1	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW2*	6 ml	50 ml	2 x 100 ml
Elution Buffer	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer CL(平衡液 CL)	6 ml	30 ml	150 ml
Blue Plus	500 μ l	1 ml	3 ml
Buffer ER2	5 ml	25 ml	120 ml
Clear Syringe(20ml)	2	10	50
HiPure DNA Maxi Column C	2	10	50
50ml Collection Tube C	4	20	100

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 P2 可能会有沉淀形成，使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8 $^{\circ}$ C 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。
- (可选)Blue Plus 特殊的颜色反应，有利于监控碱裂解过程。Blue Plus 可预先添加到 Buffer P1 中。由于 Blue Plus 不溶解于 Buffer P1 中，添加 Blue Plus 后，Buffer P1 会产生少量沉淀，使用前要摇匀。按 1ml Buffer P1 加入 4ul Blue Plus。
- 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。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

实验步骤

1. 将含目的质粒的 E. coli 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 h 小量扩增菌液。
2. 在 1L 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 16~18 小时。
为减少 RNA 污染，建议细菌培养时间控制在 16~18 小时。
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 9ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中**，高速涡旋重悬细菌，静置 10 分钟。
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。Blue Plus 可以预先加入 Buffer P1/RNase A，以起到监控裂解的作用。按每 ml Buffer P1 加入 4ul Blue Plus。
5. **涡旋 5 秒重悬细菌，加入 9ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 6~8 次**。室温静置 3 分钟，其间颠倒混匀 3 次。
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。
6. **加入 4.5ml Buffer LN3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀**。
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。
7. 8,000rpm 离心 10 分钟。

8. **取出过滤器的活塞，把第 7 步离心后的上清全部倒入过滤器中。**把过滤器的出水口对准已准备好的 50ml 离心管(自备)。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 50ml 离心管中。
9. **(可选) 彻底去除内毒素(动物注射应用时，不要省略这一步)**
 - 9a. 加入 0.1 倍体积 Buffer ER2 至滤液中，颠倒混匀，冰上放置 10 分钟。
 - 9b. 42~50°C 水浴 5 分钟。8,000 rpm 离心 10 分钟。
 - 9c. 从离心机中轻轻取出样品，不要让下层红色的溶液悬浮到上清中。把上清液转移至新 50ml 离心管(吸到下层溶液不影响产量)。
10. **加入 0.33 倍体积异丙醇至滤液或上清液中，颠倒混匀 6~8 次，静置 2 分钟。**

若第 9 步不添加 Buffer ER2 处理时，异丙醇添加量推荐为 0.3 倍，以减少 RNA 污染。
11. **(平衡柱子)将 HiPure DNA Maxi Column C 套在 50 ml 收集管中，转移 2.5 ml Buffer CL (平衡液)至柱子中，静置 2 分钟。8,000 rpm 离心 3 分钟。**
12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。转移 10~15ml 混合液(第 10 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。
13. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。重复第 12 步至混合液都转移至柱子并离心。**
14. **(可选)倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 5ml Buffer PW1 至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**

若需要获得更高产量，省略这一步操作。
15. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 10ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释) 至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**
16. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。8,000 rpm 离心 10 分钟。**

为确保彻底去除乙醇，建议取出吸附柱，打开盖子，室温放置 10~15 分钟晾干柱子。
17. **把柱子套在 50ml 离心管中，加入 1ml Elution Buffer 至柱子膜中央。静置 3 分钟。8,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，转移质粒溶液至新的 2ml 离心管中，转移至-20°C 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。

质粒浓缩(低浓度的质粒)

1. 每 1 倍洗脱液，加入 1 倍异丙醇和 0.1 倍的 Buffer LN3，颠倒混匀，室温静置 5min，13,000 rpm 离心 10min。
2. 弃上清，加入 1.0ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm 离心 5min。
3. 弃上清，加入 1.0ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm 离心 5min。
4. 弃上清，空气干燥沉淀 5-10min,根据需要体积溶解沉淀。

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 3~12 μ g)。长片段质粒(>7KB)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，养菌前最好划线活化以稳定产量。
- **异丙醇的体积:** 异丙醇加入量是上清液体积的 0.33 倍。

2. RNA 污染

- **RNase A 保质期:** Buffer P1/RNase A 保存时间不要超过 6 个月。

3. ER2 不分层或分层效果不佳

- **不分层:** 42~50 $^{\circ}$ C 才能让 ER2/内毒素形成不溶解的液泡结构，离心时必须在室温 (>15 $^{\circ}$ C) 下进行，低温离心会导致 ER2 重新溶解。
- **分层效果不佳:** 由于 ER2 的密度只比水密度稍大一些，从离心机取出必须缓慢，以免 ER2 重新悬浮到溶液中。静置 10 分钟后，让 ER2 沉淀到管底后，转移上清液。转移时，吸到少量的 ER2 不影响产量。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。