

## HiPure Plasmid EF 96 Kit B

### 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 30ug，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 0.5μg/μl，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.	P1157-01	P1157-02	P1157-03
Package	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
RNase A *	5 mg	40 mg	2 x 90 mg
Buffer P1	40 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer P2	40 ml	120 ml	2 x 300 ml
Buffer LEN3	20 ml	60 ml	300 ml
Buffer LEN4	60 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer PW1	60 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer PW2	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℃。低温下，Buffer P2/LEN4 会有沉淀形成，55℃ 水浴使沉淀完全溶解。

## 准备条件

- 短暂离心 RNase 酶管，加入 0.2~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 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°C 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 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)。
  - 不通气封口膜(用于裂解和中和)。
1. 在 24 深孔板中，加入 2.0-4.0 ml LB 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 14~16 小时扩增质粒；  
注：使用高营养的培养液(如 2 × 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. 3,000 × 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 240µl Buffer P1/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. **每孔加入 240 µl Buffer P2，贴上不透气的封口膜**。300~600RPM 振荡混匀 4 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 120µl Buffer LEN3**，贴上不透气的封口膜，300~600RPM 振荡混匀 5 分钟。
  6. **4,000 × g 离心 10 分钟**。取一块新的 Clear Plate 放置于收集板上，把上清液(吸到沉淀不会影响过滤效果)转移至 Clear Plate 中。4,000 × g 离心 2 分钟。
  7. **丢弃 Clear Plate。加入~0.55ml Buffer LEN4（等倍滤液体积）至收集板的滤液中**。然后按离心方案或负压抽流方案进行操作。

## 离心方案

8. 取一块新的 HiPure DNA Plate 放在收集板上。吸打混合液 3~5 次，然后转移全部混合液至结合板中，4,000 × g 离心 2 分钟；
9. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔加入 500 Buffer PW1。4,000 × g 离

心 2 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 750  $\mu\text{l}$  Buffer PW2，静置 2 分钟。4,000  $\times$  g 离心 3 分钟；  
注：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。
11. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔再加入 750  $\mu\text{l}$  Buffer PW2。4,000  $\times$  g 离心 2 分钟；
12. 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；
13. 取下结合板放置于 500 $\mu\text{l}$  或 1.2ml 收集板上。每孔加入 75 $\mu\text{l}$  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。
14. 每孔再加入 75 $\mu\text{l}$  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. 弃去 96 孔板，把 DNA 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 负压抽滤方案

8. 连接好真空抽盒，96 孔结合板放在抽滤盒的上盖内槽中。
9. 把第 7 步获得的上清液转移至结合板的每一个孔中。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。
10. 当压力降至零度时，每孔中加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer PW1。打开真空泵，当压力开始上升时，松开手。抽滤 3 分钟。关闭真空泵。
11. 当压力降至零度时，每孔中加入 750  $\mu\text{l}$  Buffer PW2。打开真空泵，每孔中再加入 750  $\mu\text{l}$  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。
12. 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。
13. 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。
14. (可选)取出结合板放置于 55 $^{\circ}\text{C}$  烘箱，干燥 15 分钟。
15. 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  $\mu\text{l}$  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。
16. 每孔加入 75 $\mu\text{l}$  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 75 $\mu\text{l}$  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。

**高浓度质粒的获得:** 把洗脱板放置于 55 度烘箱中, 放置 30~60 分钟让水分挥发干净, 然后加入 25~50ul 灭菌水, 振荡 10 分钟。

## 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。
- **Buffer LEN4 体积:** Buffer LEN4 加入量是上清体积的 1 倍。
- **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 P1/RNase 不要与其产品交互使用。Buffer P1/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。
- **去除 RNA 污染:** 处理某些菌液时, 得到的质粒可能存在 RNA 污染, 通过醇类重沉淀可以去除 RNA。简易沉淀流程: 加入 0.1 倍体积 3M 醋酸钠(pH5.5)和 0.7 倍体积的异丙醇至质粒溶液中, 混匀后高速离心沉淀收集 DNA, 用 70%乙醇洗涤除盐, 空气干燥加入灭菌水溶解。详细可参照分子克隆等。