

## MaxPure Plasmid EF HC Kit

### 低拷贝质粒小提中量试剂盒

本产品适合于从 20~50ml 细菌培养液中提取高浓度的低内毒素质粒 DNA。试剂盒采用独特的溶液体系和硅胶膜抽提体系，是专门为低拷贝数载体和超低拷贝数载体而设计的，质粒最高产量可达 100ug，内毒素含量<1EU/μg，浓度高达 1μg/μl。得到的质粒可直接用于细胞转染和动物注射等。

### 产品组份

产品编号	P1230-01	P1230-02	P1230-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	5 mg	20 mg
Buffer E1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer E2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer LEN3	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer LN4	15 ml	60 ml	350 ml
Buffer PW1	3 ml	6 ml	30 ml
Buffer PW2*	6 ml	6 ml	20 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	30 ml
Buffer ER2	1 ml	1 ml	5 ml
HiPure DNA Mini Column III Set	2	10	50
2 ml Collection Tubes	2	10	50

注：Extender Tube, Support Tube, HiPure EF Mini Column III、密封圈以及 50ml Centrifuge Tube 装配在一起。

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 E2/E4 会有沉淀形成，55℃ 水浴使沉淀完全溶解后使用。

## 准备事项

- 加入 0.2~0.5ml Buffer P1 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 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。
- 灭菌的 1.5ml 离心管，用于收集 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 低温下，Buffer P2/LN4 有沉淀析出，于 55℃ 水浴溶解。
- 本产品最高吸附力只能达至 100µg，处理高拷贝数载体菌液不超过 20ml。

## 实验步骤

1. 将中高拷贝数质粒的菌种接种于含有 20ml LB/抗生素培养液的培养管中，或将含低拷贝数质粒的菌种 50ml LB/抗生素培养液的培养瓶中，37℃ 摇床培养 16 小时扩增质粒。
2. 4,000-5,000 × g 离心 10 分钟，收集 20~50ml 菌体。  
HiPure DNA Mini Column III 最大吸附力为 100µg，处理中高拷贝载体时，菌液用量不要超过 20ml。处理低拷贝载体，菌液用量可最高达到 100ml，处理 50-100ml 菌液时，建议按比例扩大 P1,P2,LEN3 的用量，以充分让细菌裂解。
3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**加入 2.6ml Buffer P1/RNase A**，高速涡旋充分重悬细菌。  
使用前须把 RNase A 加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。
4. **加入 2.6ml Buffer P2**，**颠倒混匀 8~10 次**，**室温放置 3 分钟**，**其间颠倒混匀 3~5 次**。轻轻颠倒混匀，不要涡旋。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。如有必要，室温放置 2 分钟，其间颠倒混匀几次。处理多个样品时，总操作时间不要超过 4 分钟。
5. **加入 1.3ml Buffer LEN3**，**立即颠倒 10~15 次**。  
加入 Buffer LEN3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。混匀过程须轻柔而充分。
6. 室温下，>4,000 × g 离心 15 分钟。
7. 小心转移上清液至新的离心管中，**加入等倍体积 Buffer LN4**，颠倒混匀 6~8 次。
8. 取出 HiPure DNA Mini Column III，用力把最上部的管子(延长管)插紧到吸附柱中(红色)，然后再放回 50ml 离心管中。(运输过程可能会引起延长管与吸附柱接触不紧，造成第

9 步的混合液从柱子的侧边流出，而引起产量急剧下降。

9. **把第 7 步获得的混合液全部至 HiPure DNA Mini Column III Set 中，盖上盖子。**4,000 × g 离心 3~5 分钟。  
混合液体积超过 14ml 时，分二次加入。
10. 丢去延长管、底部的支撑管和 50ml 离心管，以及密封圈，只保留吸附柱。
11. 把 HiPure DNA Mini Column III 装在 2ml 收集管中。**加入 500µl Buffer PW1 至柱子中。**13,000 × g 离心 1 分钟。
12. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。**加入 650µl Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，静置 2 分钟，**13,000 × g 离心 1 分钟。
13. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。**加入 650µl Buffer PW2(已加乙醇稀释)至柱子中，**13,000 × g 离心 1 分钟。
14. 倒弃废液，把柱子套回收集管中。13,000 × g 离心 3 分钟甩干柱子。
15. **把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中(自备)。**加入 70~100µl Buffer TE 至柱子膜中央。静置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
16. **再把洗脱液转移至柱子膜中央。**静置 1 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
17. 弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

#### **(可选)进一步去除内毒素**

1. 取质粒 DNA，加入适量的 Buffer P1/RNase A 至总体积为 400ul。加入 50ul Buffer ER2 和 100ul Buffer LEN3，涡旋混匀，冰上放置 10 分钟，其间颠倒混匀 1 次。
2. 42~55℃温浴 3 分钟，13,000 × g 离心 3 分钟。
3. 转移 500ul 上清液至新的离心管中，加入 400ul 异丙醇，颠倒混匀，室温静置 5min。13,000 × g 离心 10min。
4. 弃上清，加入 1ml 的 75%乙醇洗涤沉淀，13,000 × g 离心 3min。
5. 小心吸弃所有的上清，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 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。
- **低温离心:** 加入 Buffer LN4 后, 不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** Buffer LN4 不能低温放置, Buffer E2/LN4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer LN4 体积:** Buffer LN4 加入量是上清体积的等倍。过多或不足的 Buffer LN4 会导致产量的波动。

### 2. RNA 污染

- **RNase 的用量和保质期:** RNase A 保存于 2~8 度, 长期保存时放置于-20 度。
- **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 12-16 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。