

## HiPure Plasmid EF Mega Kit

### 低内质粒超大量试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 0.5L 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 5mg，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 2μg/μl，可直接用于细胞转染和动物注射等。70 分钟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.	P1116-01	P1116-02	P1116-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	60 mg	2 x 120 mg
Buffer E1	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E2	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E3	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer E4	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E5	50 ml	250 ml	2 x 550 ml
Buffer PEW2*	20 ml	100 ml	4 x 100 ml
Buffer TE	10 ml	30 ml	120 ml
Buffer ATL	3 ml	15 ml	60 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure EF Maxi Column	2	10	50
50 ml Collection Tube	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℃。低温下，Buffer E2/E4 会有沉淀形成，55℃水浴使沉淀完全溶解。

## 实验步骤

- 加入 0.2~0.5ml Buffer E1 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 E1 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 PEW2 瓶子中于室温保存。
- 灭菌的 50ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养瓶

### 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 h 小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 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 2.5L 培养瓶中加入 500ml 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 12~14 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。纯化大柱最大结合力为 1500µg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

### 3. 转移培养液至离心管中，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 500ml 菌液。

### 4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 20ml Buffer E1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

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 20 ml Buffer E2 至重悬液，颠倒混匀 8~15 次。室温静置 3~5 分钟，其间颠倒混匀数次直至完全裂解。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。当菌液用量达 500ml

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，并稍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 20ml Buffer E3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀形成蛋花状的悬浊液。4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

加入 Buffer E3 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 500ml 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，并稍稍振荡让大块沉淀团分散成较小的团块，让 Buffer E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 取出过滤器的活塞，把第 6 步的上清全部倒入过滤器中。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。

8. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 至滤液，颠倒 6~8 次。

9. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把 MaxPure EF Maxi Column 插到真空抽滤盒的接口处。

10. 倒入 20ml 混合液(第 8 步)柱子中，打开真空泵进行抽滤，及时倒入混合液(不要空抽)至柱子中抽滤，直到所有的混合液都从柱子过滤完毕，关闭真空泵。

及时倒入混合液，不要让柱子空抽，空抽时会产生大量气泡堵塞滤膜造成抽滤速度变慢。若无抽滤系统，第 10~12 步可以用离心方法操作代替。把 MaxPure EF Maxi Column 装在 50ml 离心管中，然后加入样品或清洗液至柱子中，一次不要超过 20ml 混合液，于 3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。倒弃滤液把柱子装回收集管中，继续加入样品或清洗液至柱子并离心，最后柱子经无水乙醇清洗后，取出柱子转移至 60°C 烘箱中干燥 10 分钟。

11. 加入 20ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体抽滤完毕后，再抽滤 2 分钟。关闭真空泵，按转染级质粒提取或无内毒素质粒提取流程进行操作。

### 转染级质粒提取流程

12. 加入 20ml Buffer PEW2 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，当液体抽滤完毕后，再加入 10ml 无水乙醇，当液体抽滤完毕后，再抽滤 15 分钟干燥柱子，关闭真空泵。

13. 把 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中，加入 1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央。静置 3 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

14. 再加入 0.5~1.5ml Buffer TE 或灭菌水至柱子膜中央。静置 3 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。把质粒质粒转移至 1.5~2.0ml 离心管中，保存于 -20°C。

由于滤膜存在吸水性且离心速度转低，约有 0.4~0.5ml 洗脱液损失，进行第二次洗脱能有效洗脱出余下的质粒 DNA。处理低拷贝载体，建议第一次加入 1.5ml 洗脱液离心，第二次再加入 0.5ml 新洗脱液，最后可以得到 1.5ml 洗脱液。处理低拷贝载体或富含 RNA 菌种，质粒 DNA 可能会含有短片段 RNA，会造成 OD260 吸光值很高，质粒 OD 浓度与电泳亮度不符合。用电泳校准核酸浓度后再使用或用低内毒素质粒提到流程进一步纯化去除短片段 RNA，让质粒 OD 浓度更为准确。取质粒 DNA，用 Buffer E1/RNase A 补足 2.5ml，加入 0.5ml Buffer E3，混匀。加入 2.1ml 异丙醇，颠倒混匀 10-15 次，按低内毒素质粒的第 16~20 步进行操作。

### 低内毒素质粒和低拷贝数流程

12. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 3.0ml Buffer ATL 至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟，轻轻振荡离心管混匀滤液，让滤液中的内毒素与 ATL 中的 SDS 充分结合。
13. 加入 1.5ml Buffer E3 至柱子中，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
14. 把柱子装在新的 50ml 离心管中，轻轻振荡混匀滤液，让 SDS/钾/内毒素充分沉淀，然后全部混合液倒入至柱子中，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟过滤去除 SDS/内毒素沉淀物。第 13 步离心时，部分的 SDS/KAC 沉淀已经贴紧底管，可以不转移。
15. 丢弃柱子，转移滤液至高速离心管(自配)中，加入 0.8 体积的异丙醇至滤液中，涡旋混匀 10 秒。4°C，8,000rpm 离心 20 分钟沉淀质粒 DNA。  
若无大型高速离心机或配套的高速离心管。把混合液平均分到 4 个 2.0ml 离心管，每管约 1.8ml，4°C，13,000 × g 离心 15 分钟沉淀质粒 DNA。
16. 倒弃上清液，每管加入 5ml 80%乙醇，涡旋 5 秒。4°C，10,000 rpm 离心 5 分钟。  
若在 2.0ml 离心管中操作，每管加入 1ml 80%乙醇。4°C，13,000 × g 离心 3 分钟。
17. 倒弃上清液，短暂离心后吸弃所有残液，空气干燥 5 分钟。
18. 加入 0.3~0.5ml 灭菌水，涡旋混匀 5 秒，放置 10 分钟并振荡数次让质粒充分溶解。  
若在 2.0ml 离心管中操作，每管加入 0.1-0.2ml 灭菌水，溶解后再合并在一起。