

## HiPure Plasmid EF Maxi Kit

### 低内毒素质粒大提试剂盒

本产品采用改良硅胶柱纯化技术，适合于从 200~300ml 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 3mg，内毒素含量 < 1EU/μg，浓度高达 3μg/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

产品编号	P1114-01	P1114-02	P1114-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	10 mg	40 mg	180 mg
Buffer E1	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer E2	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer E3	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer E4	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer E5	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer PW2*	20 ml	50 ml	3 x 100 ml
Buffer TE	15 ml	30 ml	120 ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure EF Maxi Column	2	10	50
50ml Collection Tube	2	10	50
Buffer EP4(升级附送)	30 ml	120 ml	550 ml

版本号：2019-07

\*: Buffer EP4 升级说明(201907): 我司经过反复对比测试发现，升级后的 Buffer EP4 可以明显减少 RNA 污染，并提升中低拷贝载体的质粒得率。考虑到产品延续性，我司暂时不取消 Buffer E4，并将升级后 Buffer EP4 附送到产品中。使用时，只需要将 Buffer EP4 代替 Buffer E4 即可，若需对比测试数据，可联系我们。

## 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。

## 准备事项

- 加入~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，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 PW2，于室温保存。
- 灭菌的 50ml 离心管，用于收集 DNA。
- 低温下，Buffer E4 有沉淀析出，于 55℃温浴溶解。

## 实验步骤

1. 将含目的质粒的菌种接种于含有 1 ml LB/抗生素培养基的 10ml 培养管中，37℃摇床培养 6~8 小时小量扩增菌液。  
菌种保存过程存在质粒丢失现象，甘油保藏菌种须在固体平板上划线活化后，挑取单菌落进行小扩，不要直接用甘油保藏菌种进行小扩。培养瓶或培养管的体积必须大于或等于培养液体积的 4 倍。
2. 在 1L 培养瓶中加入 200~300ml 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 14~16 小时扩增菌液。  
不要用 TB 或 YT 等丰富培养基进行培养细菌。使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。
3. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 200~300ml 菌液。
4. **倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。加入 10 ml Buffer E1/ RNase A 至菌体中，高速涡旋重悬细菌。**  
彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。RNase A 可以预先加入 Buffer E1 中，该混合液可在 2-8℃保存 6 个月。
5. **涡旋 5 秒重悬细菌，加入 10 ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 10~15 次。**室温放置 3~5 分钟，其间反复颠倒混匀多次让细菌充分裂解。  
颠倒混匀，不要涡旋。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。处理多个样品时，总时间不要超过 4 分钟。

6. **加入 10 ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀。**

加入 Buffer E3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。菌液用量较多时，中和也会较难进行，中和时需要稍用力颠倒数次至溶液彻底中和。

7. 室温下，3,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

8. **取出过滤器(Clear Maxi Syringe)活塞，把第七步的上清倒入过滤器中。**把过滤器的出水口对准已准备好的 50ml 离心管。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. **测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4(~9ml)至滤液中。**颠倒混匀 6~8 次。

这一步的温度必须控制在 15~30°C，低于 15 度时，DNA 的得率会降低。不要涡旋混匀，涡旋时产生大量的泡沫，会降低 DNA 产量。

**为方便操作第 10~13 步可选用美基简易抽滤盒或 QIAVAC-24 抽滤盒进行抽滤操作。**

10. **将 HiPure EF Maxi Column 套在 50ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**2,000 × g 离心 3 分钟。

11. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，把剩余的混合液转移至柱子中。**2,000 × g 离心 3 分钟。

12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 10ml Buffer E5 至柱子中。**3,000~5000 × g 离心 3 分钟。

13. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 10ml Buffer PW2 至柱子中，静置 2 分钟，其间摇晃离心管 6~8 次，让 PW2 充分浸泡到膜中。**3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。

14. **倒弃滤液，把柱子套回 50ml 收集管中。加入 10ml Buffer PW2 至柱子中，3,000~5,000 × g 离心 10 分钟。**

HiPure EF Maxi Column 柱子底部采用封闭的抽滤设计，第 14~17 步的离心操作必须在水平/桶式离心机中进行操作，并将离心力调至最大以充分甩干试剂。

15. 取出吸附柱，于 50°C 烘干 10 分钟。

16. **把柱子套在灭菌的 50ml 离心管中(自备)。加入 1.5~2.0ml Buffer TE 至柱子膜中央。**静置 2 分钟。3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。

17. 把洗脱液转移至柱子膜中央，3,000~5,000 x g 离心 3 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

## 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 4~16μg)。
- **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 E4 后，不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** Buffer E4 不能低温放置，Buffer E2/E4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PV2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer E4 体积:** Buffer E4 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer E4 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。
- **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。