

HiPure Plasmid EF Mega K

去内毒素质粒超大量提取试剂盒

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	5 mg	25 mg	2 x 60 mg
Buffer E1	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E2	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E3	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer EP4	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer E5	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer PW2*	20 ml	100 ml	4 x 100 ml
Buffer TE	10ml	30ml	120ml
Blue Plus	0.5ml	1ml	5ml
Clear Maxi Syringe	2	10	50
HiPure EF Maxi Column	2	10	50
50 ml Collection Tube	2	10	50

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 PW2 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. 将含质粒的菌种接种于含有 1 ml LB/抗生素培养液的培养管中，37℃ 摇床培养 8 小时小量扩增菌种。
 2. 在 2-3L 培养瓶中加入 0.5L 含抗生素 LB 培养液；接种 1/1000 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 16 小时。
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. 4,000~5,000 × g 离心 15 分钟，收集 500ml 菌液。
 4. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。**加入 20ml Buffer E1/RNase A 至菌体中**，高速涡旋重悬细菌。
 5. **加入 20ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。**室温放置 2~3 分钟，其间颠倒混匀 3~5 次。
 6. **加入 20ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~30 次或直至样品充分混匀。**室温下，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。
 7. 取一个新的 Clear Maxi Syringe，取出过滤器的活塞。转移上清液(第 6 步)至针筒中。插入活塞把溶液过滤到合适的容器中。
 8. 测量滤液体积，**加入 1/3 倍体积 Buffer EP4 至滤液。**颠倒 6~8 次。

抽滤操作

9. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把 MaxPure 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，继续倒入混合液至柱子中抽滤，直到所有的混合液都从柱子过滤完毕，关闭真空泵。**

11. **加入 10ml Buffer E5 至柱子中，打开真空泵进行抽滤，抽滤完毕后，不要关闭真空泵。**
Buffer E5 必须彻底抽滤完全后，才能加入 Buffer PW2.
12. **加入 15ml Buffer PW2 至柱子，当溶液过滤完毕后，加入 15ml Buffer PW2 至柱子中。**
13. 当溶液过滤完毕后，关闭真空泵。按第 13 步进行操作。

离心操作

8. **将 MaxPure Maxi Column 套在 50ml 离心管中。转移 20ml 混合液(第 8 步)至柱子中。**
3,000 × g 离心 3 分钟。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**继续转移混合液转移至柱子中。** 3,000 × g 离心 3 分钟。
10. 重复这 9 步直至所有混和液都转移至柱子中离心完毕。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 10 ml Buffer E5 至柱子中。** 3,000~5000 × g 离心 3 分钟。
12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 15ml Buffer PW2 至柱子中，静置 2 分钟。**
3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，**加入 15ml Buffer PW2 至柱子中，** 3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。

干燥与洗脱

14. 取下柱子，装到 50ml 离心管中，4,000~5,000 × g 离心 10 分钟干燥柱子。
15. 取出吸附柱，于 50~55°C 烘干 10 分钟进一步干燥柱子。
16. 把柱子套在灭菌的 50ml 离心管中(自备)。**加入 1.0~1.5ml Buffer TE 至柱子膜中央。** 静置 3 分钟。4,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
17. **再加入 1.0~1.5ml Buffer TE 至柱子膜中央，** 静置 3 分钟。3,000~5,000 × g 离心 3 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20°C。

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 μ 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 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 EP4 后, 不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** Buffer EP4 不能低温放置, Buffer E2/E4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PVW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer EP4 体积:** Buffer EP4 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer EP4 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 2 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 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。