

## HiPure Plasmid EF Midi Kit

### 去内毒素质粒中提试剂盒（通用型）

本产品适合于从 30~50ml 细菌培养液中提取 50~250 $\mu$ g 低内毒素的质粒 DNA。产品采用独特的溶液体系，可处理各种质粒载体，包括常规高高中拷贝数的载体、大型载体，如 BAC, Cosmid, P1 等。DNA 产量取决于载体拷贝数和菌液量。纯化的质粒内毒素含量低于 0.5EU/ $\mu$ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

### 产品组份

| 产品编号                       | P1155-01    | P1155-02    | P1155-03 |
|----------------------------|-------------|-------------|----------|
| 包装次数                       | 2 次         | 10 次        | 50 次     |
| RNase A                    | 1 mg        | 20 mg       | 60 mg    |
| Blue Plus                  | 200 $\mu$ l | 900 $\mu$ l | 5.2 ml   |
| Buffer ER2                 | 1.8 ml      | 10 ml       | 50 ml    |
| Buffer P1                  | 6 ml        | 30 ml       | 140 ml   |
| Buffer P2                  | 6 ml        | 30 ml       | 140 ml   |
| Buffer LN3                 | 3 ml        | 15 ml       | 70 ml    |
| Buffer PW2*                | 6 ml        | 20 ml       | 50 ml    |
| Elution Buffer             | 1.8 ml      | 15 ml       | 60 ml    |
| Clear Midi Syringe         | 2           | 10          | 50       |
| HiPure DNA Midi Column III | 2           | 10          | 50       |
| 15 ml Collection Tube      | 2           | 10          | 50       |

版本号：2018-01

### 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 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。

## 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。
- (可选)Blue Plus 特殊的颜色反应，有利于监控碱裂解过程。Blue Plus 可预先添加到 Buffer P1 中。由于 Blue Plus 不溶解于 Buffer P1 中，添加 Blue Plus 后，Buffer P1 会产生少量沉淀，使用前要摇匀。按 1ml Buffer P1 加入 4ul Lyse Blue。
- 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。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

## 实验步骤

1. 将含目的质粒的 E. coli 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 小时扩增菌液。
2. 在 0.2L 三角瓶中加入 50ml 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 12~16 小时。
3. 4,000~5,000 x g 离心 10 分钟，收集 50ml 菌液。
4. **倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 2.5 ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋重悬细菌。**  
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。Blue Plus 可以预先加入 Buffer P1/RNase A，以起到监控裂解的作用。按每 ml Buffer P1 加入 4ul Lyse Blue。
5. **涡旋 5 秒重悬细菌，加入 2.5 ml Buffer P2 至重悬液，颠倒混匀 6~8 次。** 室温静置 2 分钟，其间颠倒混匀 3 次。  
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。
6. **加入 1.3 ml Buffer LN3 至裂解液，颠倒混匀 15~20 次或直至样品充分混匀。**  
加入 Buffer LN3 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。
7. 4,000~5,000 x g 离心 5 分钟。

8. **取出过滤器活塞，把第 7 步上清倒入过滤器中。**把过滤器的出水口对准已准备好的 15ml 离心管(自备)。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 15ml 离心管中。
9. **(可选) 彻底去除内毒素(普通细胞转染可省略这一步)**
  - 9a. 加入 0.6ml Buffer ER2 至滤液中，颠倒混匀，冰上放置 10 分钟，其间颠倒混匀 2-3 次。
  - 9b. 42~50°C 水浴 5 分钟。4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。
  - 9c. 轻轻取出样品，不要让下层红色的溶液悬浮到上清中。把上清液转移至新 15ml 离心管(吸到下层溶液不影响产量)。
10. **加入 0.33 倍体积异丙醇至滤液或上清液中，颠倒混匀 6~8 次。**

若第 9 步不添加 Buffer ER2 处理时，异丙醇添加量推荐为 0.3 倍，以减少 RNA 污染。
11. **将 HiPure DNA Midi Column III 套在 15 ml 收集管中，转移一半体积的混合液(第 10 步)至柱子中。**4,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。转移余下的混合液(第 10 步)至柱子并离心。**
13. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 4ml Buffer PW2 至柱子中。**4,000~5,000 × g 离心 3 分钟。
14. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**4,000~5,000 × g 离心 10 分钟。
15. **取出吸附柱，室温放置 10~15 分钟晾干吸附膜。**
16. **把柱子套在另一个灭菌的 15ml 离心管中(自备)。加入 0.3~0.5ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。**静置 2 分钟，4,000~5,000 × g 离心 2 分钟。

若需要更高产量，建议加入 0.5~0.75ml Elution Buffer 至柱子中。
17. **再把洗脱液转移至柱子膜中央，**4,000~5,000 × gg 离心 2 分钟。
18. **弃去柱子，把质粒保存于-20°C。**

## 质粒浓缩(低浓度的质粒)

1. 每 1 倍洗脱液，加入 0.8 倍异丙醇和 0.1 倍的 Buffer LN3，颠倒混匀，室温静置 5min，13,000 rpm 离心 15min。
2. 弃上清，加入 0.5ml 的 70%乙醇洗涤沉淀，13,000 rpm 离心 5min。
3. 弃上清，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 3~16 $\mu$ g)。长片段质粒(>7KB)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，养菌前最好划线活化以稳定产量。
- **无水乙醇的体积:** 无水醇加入量是上清液体积的 0.5 倍。

### 2. RNA 污染

- **RNASE 保质期:** Buffer P1/RNase 保存时间不要超过 6 个月。

### 3. ER2 不分层或分层效果不佳

- **不分层:** 42~50 $^{\circ}$ C 才能让 ER2/内毒素形成不溶解的液泡结构，离心时必须在室温 (>15 $^{\circ}$ C) 下进行，低温离心会导致 ER2 重新溶解。
- **分层效果不佳:** 由于 ER2 的密度只比水密度稍大一些，从离心机取出必须缓慢，以免 ER2 重新悬浮到溶液中。静置 10 分钟后，让 ER2 沉淀到管底后，转移上清液。转移时，吸到少量的 ER2 不影响产量。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。