

## HiPure Plasmid EF Midi Kit B

无内质粒中提试剂盒 B (通用型)

本产品适合于从 50~75ml 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,包括常规高低中拷贝数的载体、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	P1155-01B	P1155-02B	P1155-03B
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	20 mg
Buffer P1	8 ml	33 ml	180 ml
Buffer P2	8 ml	33 ml	180 ml
Buffer LEN3	4 ml	20 ml	90 ml
Buffer LN4	16 ml	90 ml	2 x 210 ml
Buffer PW1	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer EWB	7 ml	33 ml	180 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
HiPure DNA Midi Column III	2	10	50
15 ml Collection Tube	2	10	50

版本号: 202401

## 保存条件

本产品室温下保存 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 P2 可能会有沉淀形成，37℃ 水浴使沉淀完全溶解。Buffer LN4 在存放过程会变成黄色，不同批次的 Buffer LN4 有色差是正常现象。

## 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。

## 实验步骤

1. 将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37℃ 摇床培养 6~8 小时进行小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单菌落接种于 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，用灭菌牙签挑取单菌落进行初步培养。

2. 在 250ml 培养瓶加入 50~75ml LB/抗生素培养液，接种 0.001 倍初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 12-16 小时。

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。培养过夜后可通过菌液密度或 OD600 来判断，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。2 × 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，因菌体密度很高，建议不要超过 20~30ml。纯化中柱最大结合力为 250µg，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集 50~75ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入 3ml Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显的菌块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液

器吸打数次。

5. 加入 3ml Buffer P2 至重悬液,温和地上下颠倒并转动离心管 10~15 次,室温静置 3 分钟,其间颠倒混匀 6-8 次。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后,整个溶液变成均一的溶液而且透亮。涡旋会造成基因组污染。当菌液用量达 75ml 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,并轻稍振荡让菌体充分裂解,形成均一无团块的裂解液,总裂解时间不要超过 5 分钟。

6. 加入 1.5ml Buffer LEN3 至裂解液,上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液,4,000~5,000 rpm 离心 20 分钟。

加入 Buffer LEN3 后应立即上下颠倒混匀,以避免产生局部沉淀。当菌液用量达 75ml 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,并轻稍振荡让大块沉淀团分散成较小的团块,让 Buffer LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 转移上清液至新离心管中,加入等倍体积的 Buffer LN4,颠倒混匀 6~8 次。

8. 将 HiPure DNA Midi Column III 套在 15ml 收集管中,转移不超过 4ml 混合液至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

9. 倒弃滤液把柱子套回收集管,转移余下上清液至柱子。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。这一步需要重复 3 次才能把全部上清过滤完毕。

10. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。加入 3.0ml Buffer PW1 至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

11. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。加入 3.0ml Buffer EWB 至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

12. 倒弃滤液,把柱子套回收集管中。加入 4ml Buffer PW2 至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 10 分钟。

13. 取出 HiPure DNA Midi Column III,60°C 烘箱中放置 10 分钟晾干柱子的滤膜。倒弃收集管中的废液,并在吸水纸拍打吸弃液体晾干备用。

Buffer PW2 含 80%乙醇可以起用浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，离心管中可以用于第 13 步的质粒 DNA 收集。

14. 把柱子套在收集管中，加入 0.5ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。
15. 把柱子套在收集管中，再加入 0.3~0.5ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

由于滤膜存在吸水性，会有~0.2ml 洗脱液损失。洗脱体积不建议低于 0.5ml。为了增加质粒的回收效率，建议将得到的质粒溶液重新加入吸附柱中，进行第二次洗脱。采用附加步骤时，直接加入 0.9ml Elution Buffer 或灭菌水洗脱。由于 Buffer LN4 中含有异硫氰酸胍，由于异硫氰酸胍在 230nm 有强烈的吸光值，当质粒总量低于 100ug 时，微量的胍盐会引起 A260/230 会低于 1.0。大部分的应用可以忽略。用附加步骤浓缩纯化操作可提升 A260/230 比值。

## 附加步骤 - 质粒的浓缩

1. 取质粒 DNA (第 14~15 步) 至 2.0ml 离心管中，补加 Elution Buffer 至总体积为 800 $\mu$ l。
2. 加入 200 $\mu$ l Buffer LEN3，颠倒混匀。
3. 加入 800 $\mu$ l 异丙醇至上清液中，颠倒混匀 10~15 次。13,000rpm 离心 15min。  
离心后，DNA 沉淀物有可能看不到，特别是处理中低拷贝数载体时，DNA 产量太少形成的沉淀更不可见。受离心机角度影响，部分 DNA 沉淀可能粘附的管壁上。若 DNA 沉淀粘附不紧，离心后取出离心管后再颠倒数次让沉淀从管壁上脱落，再重复离心步骤。
4. 小心倒弃上清液，加入 1.0ml 的 75%乙醇，涡旋 5 秒，13,000 rpm 离心 3min。
5. 小心倒弃上清液，再短暂离心，吸尽所有残液，空气干燥 5min。
6. 加入适量灭菌水至沉淀中，涡旋混匀，室温放置 5-10min 让质粒充分溶解。