

HiPure Plasmid EF Maxi Kit 去内毒素质粒大提试剂盒 (通用型)

■ 目录号

TSP513

■ 产品简介

本产品适合于从100~200 mL细菌培养液中提取100~1500 µg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,包括常规高中低拷贝数的载体、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0.5 EU/µg,可直接用于细胞转染、动物注射等。

■ 产品组成

组分	TSP513(10次)	保存条件及稳定性
RNase A	60 mg	干粉15~25°C运输及保存,长期保存(>3个月)置于-20~8°C保存
Buffer CL	30 mL	15~25°C保存18个月
Buffer P1	120 mL	15~25°C保存18个月,加入RNase A后,可在2~8°C保存6个月
Buffer P2	120 mL	15~25°C保存18个月
Buffer LN3	60 mL	15~25°C保存18个月

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

Buffer PW1	60 mL	15~25°C保存18个月
Buffer PW2	50 mL	15~25°C保存18个月,加入无水乙醇后可储存6个月
Elution Buffer	30 mL	15~25°C保存18个月
Blue Plus	1 mL	15~25°C保存18个月
Buffer ER2	25 mL	15~25°C保存18个月
Clear Syringe (20 mL过滤器)	10 个	15~25°C保存18个月
HiPure DNA Maxi Column C (吸附柱)	10 个	15~25°C保存18个月
Collection Tube C (50 mL收集管)	20 个	15~25°C保存18个月

■ 产品特点

- 高产量,可结合高达3 mg质粒;
- 内毒素含量低,得到的质粒可直接用于细胞转染或动物注射实验。

■ 注意事项及准备

- 第一次使用前,加入约0.5 mL Buffer P1至RNase A干粉中,吸打5~10次让RNase A干粉充分溶解。然后将混合好的RNase A溶液全部转移至Buffer P1中,置于2~8°C保存,有效期为6个月;
- (可选) 第一次使用前,加入Blue Plus (按1 mL Buffer P1加入4 µL Blue Plus, Blue Plus特殊的颜色反应,有利于监控碱裂解过程) 至Buffer P1中。由于Blue Plus不溶于Buffer P1,添加Blue Plus后, Buffer P1会产生少量沉淀,使用前要摇匀;
- 当环境温度低时, Buffer P2可能出现浑浊或析出沉淀,使用前在37°C水浴加热几分钟即可恢复澄清。

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

- 第一次使用前,向Buffer PW2中加入无水乙醇,加入量参考瓶上标签;

- 实验前准备

设备:台式离心机、移液器、水浴锅;

耗材:50 mL离心管、1.5 mL离心管、2 mL离心管、LB培养液、培养管或培养瓶。

■ 操作步骤 (实验前请先阅读注意事项)

细菌培养

1. 取5~10 mL的培养管,加入1 mL含抗生素的LB液体培养基,将含目的质粒的*E.coli*接种于LB液体培养基中,37°摇床培养6~8 h,少量扩增菌液。
2. 在1 L培养瓶中加入100~200 mL含抗生素的LB培养液,接种0.1%初级菌液至培养瓶中,37°C摇床培养16~18 h。

注:为减少RNA污染,建议细菌培养时间控制在16~18 h。

质粒提取

3. 收集100~200 mL菌液,8,000 rpm离心3 min,收集菌体,尽量吸除上清。
 4. 加入9 mL Buffer P1 (请先检查是否已加入RNase A,可以选择加入Blue Plus监控裂解效果) 重悬菌体沉淀,静置10 min。
 5. 涡旋5 s重悬细菌,加入9 mL Buffer P2至重悬液,温和地上下翻转6~8次。室温静置3 min,其间温和地上下翻转3次,使菌体充分裂解。
- 注:此步需要温和翻转,不能剧烈震荡,以免打断基因组DNA,使提取的质粒中含有基因组DNA片段。混合后溶液呈均一且透亮的状态**

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

(若Buffer P1中加入了Blue Plus监控裂解,则混合溶液变成均一且透亮的蓝色溶液)。

6. 加入4.5 mL Buffer LN3, 立即温和地翻转15~20次, 充分混匀(此时会出现均一的白色絮状沉淀), 8,000 rpm离心10~15 min。

7. 取出过滤器的活塞, 把第6步离心后的上清全部倒入过滤器中。把过滤器的出水口对准已准备好的50 mL离心管(自备)。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到50 mL离心管中。

8. (可选, 但动物注射应用时, 该步骤不可省略) 彻底去除内毒素:

8-1. 加入0.1倍体积Buffer ER2至滤液中, 温和地上下翻转, 冰上放置10 min;

8-2. 42~50°C水浴5 min, 8,000 rpm离心10 min;

8-3. 从离心机中轻轻取出样品, 不要让下层红色的溶液悬浮到上清中, 把上清液转移至新50 mL离心管(吸到下层溶液不影响产量)。

9. 加入0.33倍体积异丙醇至滤液或上清液中, 温和地上下翻转6~8次, 静置2 min。

注:若第8步不添加Buffer ER2处理, 异丙醇添加量推荐为0.3倍, 以减少RNA污染。

10. 向放入50 mL收集管上的HiPure DNA Maxi Column C (吸附柱) 中加入2.5 mL Buffer CL, 静置2 min, 8,000 rpm离心3 min, 平衡吸附柱。

11. 转移10~15 mL混合液(第9步)至吸附柱中, 8,000 rpm离心3 min, 弃废液, 将吸附柱放回空收集管。

注:纯化柱的最大容积为15 mL, 需分2~3次过柱。若离心机转子倾角较大, 建议加入量不超过10 mL, 以防产生漏液。

12. 重复第11步至混合液都转移至柱子并离心, 弃废液。

13. (可选)将吸附柱放回空收集管。加入5 mL Buffer PW1至吸附柱中。8,000 rpm 离心3 min, 弃废液。

注:若需要获得更高产量, 省略这一步操作。

14. 向吸附柱中加入10 mL Buffer PW2 (请先检查是否已加入指定体积的无水乙醇), 8,000 rpm离心3 min, 弃废液。

15. 将吸附柱放回空收集管中, 8,000 rpm离心10 min。

16. 取出吸附柱放入干净的50 mL离心管中, 开盖, 20~25°C静置10~15 min, 使残留乙醇挥发。

17. 在吸附膜中间部位加入1 mL Elution Buffer, 20~25°C静置3 min, 8,000 rpm离心3 min。如需较多量DNA, 可将得到的溶液重新转入吸附柱中, 离心3 min, 进行二次洗脱。丢弃柱子, 转移质粒溶液至干净的2 mL离心管中, 转移至-25~-15°C保存。

■ 保存条件

保质期18个月, 试剂盒各组分保存条件见产品组成。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系: product@tsingke.com.cn。

