目 录

简 介.....2

原 理.....3

组 成.....4

保质期.....5

1. HiPure Plasmid Midi Kit 离心方案.....6

2. HiPure Plasmid Midi Kit 负压抽滤方案.....8

3. HiPure Plasmid Maxi Kit 离心方案.....9

4. HiPure Plasmid Maxi Kit 负压抽滤方案.....11

5. HiPure Fast Plasmid 96 Kit 离心方案.....12

6. HiPure Fast Plasmid 96 Kit 负压抽滤方案.....14

7. 质粒的浓缩.....16

8. 简易的负压抽滤装置.....17

常见问题回答.....18

版本: 2020-12

简 介

HiPure Plasmid Kits 为常规的质粒制备提供了快速而经济的解决方案。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，可在 15-60 分钟完成抽提工作。整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR 和标记等。

- HiPure Plasmid Micro Kit 适合于从 1-5ml 细菌培养液中纯化 1-40μg 质粒 DNA。
- HiPure Plasmid Mini Kit 适合于从 5-15ml 细菌培养液中纯化 10-80μg 质粒 DNA
- HiPure Plasmid Midi Kit 适合于从 15-50ml 细菌培养液中纯化 30-250μg 质粒 DNA。
- HiPure Plasmid Maxi Kit 适合于从 50-200ml 细菌培养液中纯化 0.1-1mg 质粒 DNA。
- HiPure Plasmid 96 Kit I 适合于从 96 个 1-5ml 细菌培养液中纯化 1-20μg 质粒 DNA。

产品名称	Plasmid Micro Kit	Plasmid Mini Kit	Plasmid Midi Kit
产品编号	P1001	P1002	P1003
菌液用量	1-5 ml	5-15 ml	15-50 ml
结合能力	35 μg	70 μg	250 μg
离心机	小型离心机	小型离心机	中型离心机(15ml)
浓度	0.1-1μg/μl	0.1-1μg/μl	0.1-0.5μg/μl
洗脱体积	30-100 μl	60-200 μl	0.3-0.5 ml

产品名称	Plasmid Maxi Kit	Plasmid 96 Kit I
产品编号	P1004	P1005
菌液用量	50-200 ml	1-5 ml
结合能力	1 mg	20 μg
离心机	桶状水平离心机(50ml) 3,000-4,000 x g	桶状水平离心机 3,000-4,000 x g
浓度	0.1-0.7 μg/μl	0.1-0.7 μg/μl
洗脱体积	1.0-3.0 ml	50-100μl

原 理

HiPure 质粒提取系列将经典的碱裂解法和硅胶柱纯化技术结合在一起，为常规的质粒制备提供了快速而经济的解决方案。其原理及流程主要包括：

- **碱裂解法处理**

  离心收集细菌，加入缓冲液(Buffer P1)重悬细菌，加入碱性裂解液(Buffer P2)裂解细菌，加入带有高盐的中和液(Buffer NP3)进行中和；新型的 Buffer NP3 与其它产品有着很大的差别，得到的混匀液只需 1-2 分钟离心就可获得澄清的上清液；其它产品往往需要离心 10 分钟，而且得到的上清液还经常有颗粒悬浮。

- **硅胶柱吸附**

  HiPure DNA 柱（也叫硅胶柱）采用玻璃纤维滤膜为基质，在高盐条件下玻璃纤维滤膜可吸附核酸，而蛋白质，降解的 RNA 等杂质不会被吸附而去除。中和液已加入高盐条件，得到的上清液可直接上柱，经离心或抽滤过滤，质粒 DNA 就会结合至硅胶柱的基质上，而蛋白质和其它杂质不吸附，随溶液一起滤出。

- **洗涤除盐和洗脱出核酸**

  硅胶柱吸附质粒后，(可选)加入高盐溶液（Buffer PW1）进行洗涤去除痕量的杂质；加入含乙醇的溶液(Buffer PW2)洗涤去除盐份；离心干燥去除膜上残留的乙醇；最后用 Tris 缓冲液或灭菌水洗脱出 DNA。洗脱出来的 DNA 可直接用于下游的各种用途。

组 成

HiPure Plasmid Midi Kit

Cat.No.	P1003-01	P1003-02	P1003-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	30 mg
Buffer P1	6 ml	60 ml	250 ml
Buffer P2	6 ml	60 ml	250 ml
Buffer P3	9 ml	80 ml	2 x 200 ml
Buffer PW1	6 ml	15 ml	60 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

HiPure Plasmid Maxi Kit

Cat.No.	P1004-01	P1004-02	P1004-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	30 mg	60 mg
Buffer P1	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer P2	50 ml	220 ml	2 x 550 ml
Buffer P3	80 ml	320 ml	3 x 550 ml
Buffer PW1	20 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW2*	20 ml	50 ml	2 x 100 ml
Elution Buffer	20 ml	30 ml	120 ml
HiPure DNA Maxi Column III	2	10	50
50ml Collection Tube	2	10	50

组 成

HiPure Plasmid 96 Kit I

Cat.No.	P1005-01	P1005-02	P1005-03
Package	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
RNase A	5 mg	20 mg	60 mg
Buffer P1	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer P2	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer P3	40 ml	170 ml	2 x 400 ml
Buffer PW1	60 ml	220 ml	3 x 400 ml
Buffer PW2*	50 ml	3 x 50 ml	7 x 100 ml
Elution Buffer	15 ml	60 ml	250 ml
HiPure DNA Plate	1	4	20
2.2 ml Collection Plate	1	4	20
0.5ml Collection Plate	1	4	20

保 存 条 件 与 保 质 期

HiPure 质粒提取试剂盒在室温下（15-25℃）干燥保存 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。使用前 37℃水浴使沉淀完全溶解。

1. HiPure Plasmid Midi Kit 离心方案(P1003)

该方案采用离心方法，适合于从 15-50ml 细菌培养液中提取 50-250μg 高拷贝质粒 DNA。提取低拷贝数的质粒时，只需增加一倍 Buffer P1、Buffer P2、Buffer NP3，即可处理 50-100ml 的细菌培养液。 ◆代表高拷贝质粒（每 ml 菌液含有大于 4ug 质粒），■代表中低拷贝质粒（每 ml 菌液含有小于 4ug 质粒）。

准备条件

- 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至 Buffer PW2 瓶子中于室温保存。
- 灭菌的 15ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 大型高速心机，离心力大于 10,000 x g。
- 15-50ml 耐高速的离心管。

1. 将含质粒的菌种接种于含有 1 ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37℃摇床培养 8 小时扩增菌液。

   甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线挑取单菌落进行小量扩增，不要直接用甘油保藏菌种进行培养。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◆200ml 培养瓶加入 30-50ml(高拷贝质粒) LB/抗生素培养液； 或在■500ml 培养瓶中加入 50-100ml (低拷贝质粒)LB/抗生素培养液。接种 1/1000 初级菌液至培养瓶中。37℃摇床培养 12-16 小时；

3. ≥4,000 × g 离心 10 分钟，收集◆30-50ml 或■50-100ml 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◆2.5ml 或■5ml Buffer P1/RNaseA 混和液，涡漩重悬细菌。**

   使用前，须确保 RNase A 已经加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的。重悬后应看不到细胞团块。

5. **加入◆ 2.5ml 或■ 5ml Buffer P2，轻轻颠倒离心管 10~12 次。**室温静置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀几次。

   轻轻颠倒混匀，不要涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。菌液用量较多时，裂解液会很

粘稠而难混匀。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。如有必要，可一直缓慢颠倒混匀至裂解液变得粘稠而透亮，但这一步总操作时间不要超过 4 分钟。

6. **加入◆3.5 ml 或■7 ml Buffer P3，立即颠倒混匀 10-15 次。**

   加入 Buffer P3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。混匀过程必须轻柔而充分。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. ≥4,000 × g 离心 20 分钟。

8. 将 HiPure DNA Midi Column III 套在 15ml 收集管中。**转移 4ml 上清液至柱子中。**≥4,000 × g 离心 2 分钟。

   室温较低时，上清液放置过程中可能会有沉淀折出而显浑浊现象（SDS 析出引起的），于 37-55 度温育 1~2 分钟澄清后再过柱。

9. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。继续转移上清液至柱子中。≥4,000 × g 离心 2 分钟。

10. 重复第 9 步直至所有的上清液都转移至柱子中过滤。

11. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。**加入 1ml Buffer PW1 至柱子中，**≥4,000 × g 离心 2 分钟。

12. **加入 4ml Buffer PW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。**≥4,000 × g 离心 10 分钟。

    在开始使用 Buffer PW2 之前，必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签所示。取出柱子时不要让柱子的底部碰到液体，若碰到液体再离心一次。

13. 取出吸附柱，室温放置 10~15 分钟晾干吸附膜。

14. 把柱子套在另一个灭菌的 15ml 离心管中(自备)。**加入 0.4~0.6ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。**静置 3 分钟，≥4,000 × g 离心 2 分钟。

    若需要更高产量，建议加入 0.5~0.6ml Elution Buffer 至柱子中。

15. **再把洗脱液转移至柱子膜中央，**≥4,000 × g 离心 2 分钟。

16. 弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

2. HiPure Plasmid Midi Kit 负压抽滤方案(P1003)

该方案采用负压抽滤方法，适合于从 15-100ml 细菌培养液中提取 50-250μg 高纯度的质粒 DNA。

该方案需要准备以下材料或工具：

- 真空泵
- 真空抽滤盒(若没有真空抽滤盒，可按附表进行简易的真空抽滤方案)

1. 按离心方案 4 第 1-7 步进行操作。

   室温较低时，上清液放置过程中可能会有沉淀折出而显浑浊现象（SDS 析出引起的），于 37-55 度温育 1~2 分钟澄清后再过柱。

2. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把 HiPure DNA Midi 柱插到真空抽滤盒的接口处。(若没有真空抽滤盒，可按附表中的简易抽滤方法进行操作。)

3. 把第七步获得的上清液转移至柱子中。打开真空泵进行抽滤，让溶液从柱子过滤，继续把上清液转移柱子中进行抽滤，直至所有上清液都从柱子中过滤完毕。

4. 当溶液过滤完毕后，加入 1ml Buffer PW1 至柱子中。

5. 当溶液过滤完毕后，加入 4ml Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。

   在开始使用 Buffer PW2 之前，必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签。

6. 取下柱子，把柱子套回 15ml 离心管中。≥4,000 x g 离心 10 分钟。

7. 取出吸附柱，室温放置 10~15 分钟晾干吸附膜。

8. 把柱子套在另一个灭菌的 15ml 离心管中(自备)。**加入 0.4~0.5ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。**静置 2 分钟，≥4,000 x g 离心 3 分钟。

   若需要更高产量，建议加入 0.5~0.6ml Buffer Elution Buffer 至柱子中。

9. **再把洗脱液至柱子膜中央。**≥4,000 x g 离心 3 分钟。

10. 弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

3. HiPure Plasmid Maxi Kit 离心方案(P1004)

该方案采用离心方法，适合于从 50-200ml 细菌培养液中提取 0.4-1mg 高拷贝质粒 DNA。提取低拷贝质粒时，只需增加 Buffer P1、Buffer P2、Buffer NP3 的用量，即可处理 200-400ml 细菌培养液。◆代表高拷贝质粒（每 ml 菌液含有大于 4ug 质粒），■代表中低拷贝质粒（每 ml 菌液含有小于 4ug 质粒）。

准备条件

- 加入~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打 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，加入无水乙醇至 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管或培养瓶
- 桶状水平式离心机，离心力大于 3,000 x g
- 大型高速心机，离心力大于 10,000 x g
- 50-100ml 耐高速的离心管

1. 将含质粒的菌种接种于含有 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37℃摇床培养 8 小时扩增菌液。

   注：甘油保藏的菌种须在固体培养平板上划线挑取单菌落进行小量扩增，不要直接采用甘油保藏菌种进行培养。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 100-200ml（高拷贝质粒）含抗生素 LB 培养液； 或在■ 2L 培养瓶中加入 200-400ml(低拷贝质粒)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 12-16 小时。

3. ≥4,000 x g 离心 10 分钟，收集◆100-200ml 或■200-400ml 菌液。

4. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**加入◆10ml 或■20ml Buffer P1/RNase A 混和液，涡漩重悬细菌。**

   使用前，必须确保 RNase A 已经加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。

5. **加入◆10 ml 或■20 ml Buffer P2，轻轻颠倒离心管 10~12 次。**室温静置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀几次。

   轻轻颠倒混匀，不要涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。菌液用量较多时，裂解液会很

粘稠而难混匀。如有必要，可一直缓慢颠倒混匀至裂解液变得粘稠而透亮，但这一步总的操作时间不要超过 4 分钟。

6. **加入◆14 ml 或■28 ml Buffer P3，颠倒混匀 10-15 次。**
   混匀过程必须轻柔而充分。菌液用量较多时，中和会较难进行，需稍用力颠倒数次至充分中和。

7. ≥4,000 x g 离心 20 分钟。

8. 将 HiPure DNA Maxi Column 套在 50ml 收集管中。转移 20ml 上清液至柱子中。≥4,000 x g 离心 3 分钟。
   室温较低时，上清液放置过程中可能会有沉淀折出而显浑浊现象（SDS 析出引起的），于 37-55 度温育 1~2 分钟澄清后再过柱。

9. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。把剩余的上清液转移至柱子中，≥4,000 x g 离心 3 分钟。

10. 重复第 9 步直至所有的上清液都转移至柱子中离心过滤。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 5 ml Buffer PW1 至柱子中，静置 2 分钟。**≥4,000 x g 离心 3 分钟。

12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 15 ml Buffer PW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中**。≥4,000 x g 离心 3 分钟。
    在开始使用 Buffer PW2 之前，必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签所示。

13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 5 ml 无水乙醇至柱子中**。≥4,000 x g 离心 10 分钟。

14. 取出吸附柱，于 50~55℃ 烘干 10 分钟或室温放置 10~15 分钟干燥滤膜。

15. 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 2 分钟。≥4,000 x g 离心 2 分钟。

16. **再把洗脱液至柱子膜中央**，≥4,000 x g 离心 3 分钟。弃去柱子，把质粒保存于 -20℃。

4. HiPure Plasmid Maxi Kit 负压抽滤方案(P1004)

该方案采用负压抽滤方法，适合于快速地从 50-400ml 细菌培养液中提取 0.5-1 mg 高纯度的质粒 DNA。该方案需要准备以下材料或工具。

- 真空泵
- 真空抽滤盒(若没有真空抽滤盒，可按附表进行简易的真空抽滤方案)

1. 按离心方案 6 的第 1-7 步进行操作。

   室温较低时，上清液放置过程中可能会有沉淀折出而显浑浊现象（SDS 析出引起的），于 37-55 度温育 1~2 分钟澄清后再过柱。

2. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把结合柱插到真空抽滤盒的接口处。

3. 把第七步获得的上清液倒入结合柱中。打开真空泵进行抽滤，让溶液从柱子过滤。继续把上清液倒入柱子中进行抽滤。

4. 当溶液过滤完毕后，加入 5ml Buffer PW1 至柱子中，静置 2 分钟。

5. 当溶液过滤完毕后，加入 15ml Buffer PW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。

   在开始使用 Buffer PW2 之前，须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签所示。

6. 当溶液过滤完毕后，加入 10ml 无水乙醇至柱子中。

7. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。≥4,000 x g 离心 10 分钟。

8. 再把柱子转移抽滤盒中，打开真空抽滤 5~10 分钟让柱子充分干燥。

9. 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 2 分钟。≥4,000 x g 离心 3 分钟。

   若需要更高产量，建议加入 1.5~2.0ml Elution Buffer 至柱子中。

10. **再把洗脱液至柱子膜中央**，≥4,000 x g 离心 3 分钟。

11. 弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

5. HiPure Plasmid 96 Kit I 离心方案(P1005)

该方案采用离心方法，适合于从 96 个 1-5 ml 细菌培养液中提取质粒 DNA。

准备条件

- 加入 0.5~1ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 3~5 次让 RNase A 干粉充分溶解，把 RNase A 全部转移至 Buffer P1 中，于 2-8℃保存。
- 按瓶子标签所示，加入无水乙醇至 Buffer PW2 瓶子中于室温保存。
- 灭菌的 0.5ml 96 孔板，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和 96 孔深孔板。
- 桶状水平式离心机，离心力大于 3,000 x g。
- 封口膜

1. **在 96 深孔板中，加入 1.0-1.5 ml 2 x YT 或 TB 培养液，将含质粒的菌种接种于每个孔中，贴上可透气的封口膜或盖上盖子。**37℃，220rpm 摇床培养 20~24 小时扩增质粒。

   培养细菌时，也可以采用 LB 培养液。使用高营养的培养液(如 2 X YT)可获得更高的产量，因为细菌生长密度提升。处理低拷贝的质粒时，我们推荐使用 2 x YT 培养液。该方案最大处理 5ml 菌液，可用 24 孔板进行培养。处理 5ml 菌液时，只能使用 LB 培养液。

2. 2,000-3,000 × g 离心 10 分钟收集菌体。

3. 撕弃封口膜，倒弃培养液，并把 96 孔板反扣于吸水纸上，轻轻拍打几下以吸尽残液。**每孔中加入 250 µl Buffer P1/RNase A 混和液，**放置于 IKA MS3 涡旋仪上，最高速度涡旋 3~5 分钟重悬细菌。

   使用前，须确保 RNase A 已加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。(建议使用 8 道 1ml 的移液枪来转移溶液)。

4. **每孔中加入 250µl Buffer P2，**放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600RPM 振荡混匀 3 分钟。

   Buffer P2 中含有 SDS，使用前检查 Buffer P2 中是否有沉淀形成。若有沉淀可于 37℃放置一会使之溶解。

5. **每孔中 350µl Buffer NP3，**放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600RPM 振荡混匀 5-10 分钟。

6. 3,000-5,000 x g 离心 10 分钟。

7. 把 HiPure DNA Plate 放在收集板上。转移上清液至结合板的孔中(吸取小量沉淀不影响纯度)。3,000 x g 离心 3 分钟；

   低温下上清残留的 SDS 可能会折出。产物沉淀时，于 37-55 度温育 30-60 秒使之溶解再过柱。

8. 倒弃滤液，把结合板放回收集板上。每孔中加入 500 µl Buffer PW1。3,000 x g 离心 3 分钟；

   处理 end A-的菌株，如 DH5a 和 JM109 时，可省略这一步。处理富含核酸酶(end A+)菌株时，如 HB101，不能省略这一步，否则残留的核酸酶会降解质粒。

9. 倒弃滤液，把结合板放回收集板上。每孔中加入 800 µl Buffer PW2。3,000 x g 离心 3 分钟；

   使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。

10. 倒弃滤液，把结合板放回收集板上。每孔中加入 800 µl 80%乙醇。3,000 x g 离心 3 分钟；

11. 倒弃滤液，把结合板放回收集板上。最大速度(~4,000 x g) 离心 10 分钟；

12. (可选) 取出结合板放置于 55℃烘箱，干燥 10 分钟。

13. 取下结合板放置于 500µl 或 1.2ml 收集板上。**每孔中加入 70-120µl Elution Buffer 或灭菌水至结合板的膜中央。**放置 2 分钟。最大速度(~4,000 x g)离心 5 分钟。

14. (可选，浓缩 DNA) 取出洗脱板放置于 55℃烘箱放置 30-60 分钟浓缩 DNA。

15. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于 4℃或-20℃。

6. HiPure Plasmid 96 Kit I 抽滤方案(P1005)

该方案采用抽滤方法，适合于从 96 个 1.3 ml 细菌培养液中提取质粒 DNA。

1. 按方案 8 的第 1-6 步进行操作；
2. 把废液收集槽放在真空抽滤盒的底部的内槽中。
3. 盖上真空抽滤盒的上盖，把 HiPure DNA Plate 放在上盖的内槽中。
4. 连接好真空泵和真空抽滤盒。
5. 用移液枪小心把第 6 步获得的上清液转移至结合板中。
6. 打开真空泵，压紧结合板。当压力开始上升，松开手，抽滤 3 分钟。
7. 关闭真空泵，当压力降至零度时，每孔中加入 500 μl Buffer PW1。打开真空泵，压紧结合板。当压力开始上升时松开手。抽滤 3 分钟。
8. 每孔中加入 800 μl Buffer PW2。抽滤 1 分钟。
9. 每孔中加入 800 μl 80%乙醇。抽滤 1 分钟。
10. 每孔中加入 200 μl 无水乙醇。抽滤 3 分钟。
11. 关闭真空泵，当压力降至零度时，取下结合板。在一叠吸水纸上用力垂直拍打 7-8 次，使孔壁的液滴流出。
12. 把结合板重新放回抽滤盒中。打开真空泵，用手压住上盖，当压力上升至最高时，松开手。继续抽滤 10 分钟。随着抽滤时间的增加，压力会缓慢下降。
13. (可选)取出结合板放置于 55℃烘箱，干燥 15 分钟。
14. 移开抽滤盒的上盖，倒弃废液槽中的液体。把废液槽放回抽滤盒中，并在其上部放置一块 500 μl 收集板。盖上抽滤盒的上盖，调整结合板的位置，使之结合板底部的每个突出部分都插入收集板。
15. 加入 75-100μl Elution Buffer 或灭菌水至结合板的膜中央，静置 2 分钟。打开真空泵抽滤 3 分钟。关闭真空泵。

16. (可选，浓缩 DNA) 取出洗脱板放置于 55℃烘箱放置 30-60 分钟浓缩 DNA。

17. 倒弃结合板，在收集板上贴上封口膜，把质粒保存于 4℃或-20℃。

7. 质粒的浓缩

HiPure Plasmid Kits 纯化质粒的浓度一般为 100-600ng/μl。若需要高浓度的质粒 DNA，可按以下方案进行浓缩。

1. 取适量的质粒 DNA 至 2ml 离心管中。
2. 加入 0.1 倍体积 3M NaAc, pH5.5 和 0.8 倍体积的异丙醇，涡旋混匀；
   举例：1ml 质粒溶液，加入 100μl 3M NaAc,pH5.5 和 800μl 异丙醇。
3. 13,000 x g 离心 10 分钟。小心倒弃上清液。
4. 加入 1ml 70%乙醇，涡旋混匀。
5. 13,000 x g 离心 3 分钟。小心倒弃上清液。
6. 13,000 x g 离心 1 分钟；
7. 用 10μl 或 200μl 的移液枪小心吸弃所有的残液。不要让移液枪的枪头碰到沉淀。
8. 空气干燥 10 分钟。
9. 加入适量 Elution Buffer 或灭菌水充分溶解质粒 DNA。
10. 把质粒 DNA 保存于-20℃。

8. 简单的负压抽滤操作

若没有相应的抽滤盒，可按下述方案进行简易的负压抽滤操作。

1. 用导管连接好三角抽滤瓶和真空泵。
2. 用合适的橡皮塞塞住三角抽滤瓶的瓶口。
3. 在橡皮塞上插入针头，使之穿过橡皮塞。
4. 打开真空泵，检查密封效果和针头处是否有真空。若密封效果好，而针头接口处没有真空，可能是因插入针头时，针头尖端被橡皮碎片堵住了。取出橡皮塞，小心不要被针头扎伤。去除针头尖端处的橡皮碎片。把橡皮塞塞回瓶口。
5. 把 HiPure DNA Columns 底部突出部位插到针头接口处。
6. 按负压抽滤方案进行操作。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排扰难解。

现象及原因	解决方法
产量低或无产量	
质粒拷贝数低；	提高菌液用量，按低拷贝数方案进行操作。
真菌污染；	培养液受到真菌污染。因真菌不受一般抗生素的影响，因培养液受到真菌污染，会出现碱裂解时溶液不清亮，产量明显下降等现象。重新培养。
培养条件有问题	检查培养条件，抗生素用量等。
菌种老化	进行中大量提取时，若菌种是在甘油中保存时，建议先划板活化菌种，挑单菌落接种至 1ml 培养液中培养 8 小时后再扩大培养。
Buffer P2 有沉淀或失效	Buffer P2 中的 SDS 在低温时可能会有沉淀析出，使用前需水浴使用溶解；Buffer P2 可能会被空气中 CO2 中和而失效。可重新配制。（0.2 M NaOH, 1% SDS）
细菌没有彻底重悬	细菌沉淀团必须在 Buffer P1/RNase A 混合液中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量。
Buffer PW2 没有用乙醇稀释	Buffer PW2 在使用前须用无水乙醇进行稀释。收到试剂盒后，应尽快把乙醇加到 Buffer PW2 中，以防止微生物的污染。
洗脱时有问题或洗脱体积太少	洗脱核酸最好使用 Elution Buffer (10mM Tris, pH8.5)，灭菌水因 pH 较低，显酸性，而导致洗脱效率下降。洗脱液必须加到柱子的膜的中央；增加洗脱次数或洗脱液的体积。
裂解不充分	处理较多菌体时，加入 Buffer P2 裂解时释放的基因组 DNA 让溶液变得非常粘稠而难于混匀。增加颠倒混匀的次数，并室温静置 2-3 分钟，其间偶尔颠倒混匀让细菌充分裂解。
中和不充分	处理较多菌体时，裂解液非常粘稠，加入 Buffer NP3 需要更多的颠倒混匀次数，以到达充分中和效果。理想的中和效果：白色沉淀物比较分散，溶液均匀，沉淀内部不存在黄色粘稠液体。

角度离心机	HiPure Maxi DNA Column 因内径比较大，须用水平/桶状离心机。使用固定角度离心机会大大降低柱子的结合效率。

基因组 DNA 污染

Buffer P2 裂解出现问题	加入 Buffer P2 时，必须轻柔颠倒混匀；处理多个样品时，加入 Buffer P2 时算起，总时间不要超过 4 分钟。
Buffer NP3 中和时出现问题	加入 Buffer NP3 后，应立即轻轻颠倒混匀，一般需要 6~10 次。若处理菌液较多时，需要 10~20 次才能让溶液充分中和。
细菌培养时间过长	培养太长时间的菌液中含有死去的细菌和降解的 DNA。菌液的培养时间不要超过 16 小时。

RNA 污染

Buffer P1 不含有 RNase A	使用前，没有把 RNase A 加到 Buffer P1 中。
Buffer P1/RNase A 混合液过期	Buffer P1/RNase A 混合液可于 4 度保存 6 个月。超过 6 个月后，可能需要再加入 RNase A.
细菌密度太高	减少菌液的使用量

下游实验结果不理想

盐分污染	加入 Buffer PW2 后，静置 5 分钟后，再离心，然后再加入 80% 乙醇洗涤柱子。
核酸酶污染	使用 endA+的菌株如 HB101 或其它野生型菌株，可能含有高丰度的核酸酶，最好使用 HiPure Bacterial Plasmid Mini Kit.
乙醇污染	确保离心干燥时，离心速度必须达到要求。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的。通过 10,000xg 离心 2 分钟，然后再把质粒转移至新的离心管中。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。

Note：