

## 目 录

简 介	2
原 理	2
组 成	3
保质期	3
准备工作	3
方案 1:HiPure Fast Plasmid 96 Kit 离心方案	4
方案 2:HiPure Fast Plasmid 96 Kit 抽滤方案	6
常见问题回答	8

版本: 2019-10

## 简介

HiPure Fast Plasmid 96 Kit 为高通量质粒制备提供了一种简单而经济的方法。该方案采用两块板方案，可在 60 分钟完成 2 块 96 孔板的质粒抽提工作，操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提。HiPure Fast Plasmid 96 Kit 适合于从 1.3ml 细菌培养液中纯化质粒 DNA。纯化的质粒可直接用于自动测序，酶切，PCR，标记等。

## 原理

HiPure 质粒提取试剂盒系列是基于先用碱裂解法处理，经过过滤板过滤去除杂质，得到澄清的上清液后，再用异丙醇沉淀回收质粒 DNA。流程主要包括有：

- 碱裂解法处理：  
离心收集细菌，然后加入缓冲液中重悬，碱溶液裂解，加入中和液进行中和；
- 过滤去除蛋白质等杂质：  
碱裂解液得到的中和液，通过过滤板过滤去除杂质，得到澄清的裂解液；
- 硅胶板纯化  
得到的滤液中，转移至 96 孔结合板进一步纯化 DNA。

## 保质期

HiPure 质粒提取试剂盒可在室温下（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，溶液可能会有沉淀形成，需 37℃水浴让沉淀完全溶解。当 RNase A 加到 Buffer P1 后，该混合液可在 2-8℃保存 6 个月。

## 组 成

### HiPure Fast Plasmid 96 Kit

Cat.No.	P1006-01	P1006-02	P1006-03
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	250 ml	3 x 400 ml
Buffer PW2*	50 ml	2 x 50 ml	4 x 100 ml
Elution Buffer	15 ml	120 ml	500 ml
HiPure DNA Plate	1	4	20
Clear Plate	1	4	20
1.6ml Collection Plate	1	4	20

## 准备工作

- 加入 0.2~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 充分溶解，然后把 RNase A 全部转移至 Buffer P1，于 2-8℃ 保存，有效期为 6 个月。
- 桶状水平式离心机(~3,000 x g 或~6,000 x g)
- 2.2ml 96 孔细菌培养板或 48 孔板细菌培养板
- (可选) 可透气的封口膜
- 8 道 1ml 移液枪
- IKA MS3 振荡仪或其它带 96 孔适配器的振荡仪
- 80%乙醇
- 55℃ 烘箱
- 96 孔 0.5ml 板

## 方案 1: 96 孔质粒提取的离心方案

该方案采用离心方法，适合于从 96 个 1-1.5 ml 细菌培养液中提取质粒 DNA。

1. 在 96 深孔板中，加入 1-1.5 ml 2 × YT 或 TB 培养液，将含目的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°C，220rpm 摇床培养 20~24 小时扩增质粒。

注：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，推荐使用 2 × YT 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 250µl 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。

注：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。

注：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，可置于 37°C 溶解。

5. **每孔中加入 350µl Buffer P3**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600rpm 振荡混 5-10 分钟。

6. (可选)3,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

7. 取一块 Clear Plate 放置于收集板上。把第 6 步的获得的上清液转移至 Clear Plate 中。3,000 × g 离心 5 分钟。

使用 8 道 1ml 移液枪来转移溶液。多数的沉淀会粘附在孔底上。沉淀不含质粒，无需转移。转移小量的沉淀不会影响结果。

8. 丢弃过滤板。取一块 HiPure DNA Plate 收集板上。把第 7 步获得的滤液全部转移至 HiPure DNA Plate 中。3,000 × g 离心 5 分钟。

若离心机的转子适合，可以将 Clear Plate 放置在 HiPure DNA Plate 上，然后再一起放置到合适的废液收集盒(可用枪头的盖子作为废液收集盒)上。把第 6 步上清液全部转移至过滤板中。

室温放置 5 分钟。3,000 × g 离心 5 分钟。这样就可以将第 7 步和第 8 步合并在一起。

9. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔中加入 500µl Buffer PW1。  
3,000 × g 离心 5 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。
10. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔中加入 700µl Buffer PW2。  
3,000 × g 离心 5 分钟。  
注：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。若低温保存，请恢复至室温。
11. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。每孔中加入 700µl 80%乙醇。  
3,000 × g 离心 5 分钟。
12. 倒弃收集板中的滤液，把结合板放回收集板上。最大速度(~4,000 × g) 离心 10 分钟。
13. (可选) 取出结合板放置于 55℃烘箱，干燥 10 分钟。
14. 取下结合板放置于 500µl 或 1.2ml 收集板上。**每孔中加入 70-100µl Elution Buffer 或灭菌水至结合板的膜中央**，室温放置 3 分钟。最大速度(~4,000 × g)离心 3 分钟。
15. (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。
16. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于 4℃或-20℃。

## 方案 2: 96 孔质粒提取的负压抽滤方案

该方案采用负压抽滤方法，适合于从 96 个 1-1.5 ml 的细菌培养液中提取质粒 DNA。

1. 在 96 深孔板中，加入 1-1.5 ml 2 × YT 或 TB 培养液，将含目的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°C，220rpm 摇床培养 20~24 小时扩增质粒。

注：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 × YT 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。

注：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 250 μl Buffer P2**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600rpm 振荡混匀 3 分钟。

注：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°C 放置一会使之溶解。

5. **每孔中加入 350 μl Buffer P3**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600rpm 振荡混 5-10 分钟。

6. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟。

7. 把废液收集槽放在真空抽滤盒的底部的内槽中。把 HiPure DNA Plate 放置在废液收集槽上。盖上真空抽滤盒的上盖。

8. 把 Clear Plate 放在上盖的内槽中。调整 Clear Plate 的位置，使其的出口插到 HiPure DNA Plate 对应的孔中。连接好真空泵和真空抽滤盒。

9. 用移液枪把第 6 步获得的上清液转移至 Clear Plate 中。

10. 打开真空泵，用手压紧 Clear Plate。当压力开始上升，松开手。此时压力会缓慢上升到一定压力，溶液会过滤到 HiPure DNA Plate 中。抽滤 5 分钟；

11. 关闭真空泵，当压力降至零时。丢弃 Clear Plate。移开抽滤盒的上盖。取出 HiPure DNA Plate 放在抽滤盒的上盖内槽中。盖上抽滤盒的上盖。
12. 打开真空泵，用手压紧住 HiPure DNA Plate。当压力开始上升，松开手。抽滤 5 分钟；关闭真空泵。
13. (可选) 当压力降至零时，**每孔中加入 500  $\mu$ l Buffer PW1**。打开真空泵，用手压 DNA Bind Plate，当压力开始上升时，松开手。抽滤 3 分钟。
14. **每孔中加入 800  $\mu$ l Buffer PW2**。抽滤 3 分钟。
15. **每孔中加入 800  $\mu$ l 80%乙醇**。抽滤 3 分钟。
16. 关闭真空泵，当压力降至零时，取下结合板。在吸水纸上用力垂直拍打 7-8 次。
17. 把结合板放回抽滤盒中。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 15 分钟。随着抽滤时间的增加，压力会缓慢下降。
18. (可选)取出结合板放置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱，干燥 15 分钟。
19. 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  $\mu$ l 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。
20. **加入 50-100 $\mu$ l Elution Buffer 或灭菌水至结合板的膜中央，静置 3 分钟**。打开真空泵抽滤 5 分钟。关闭真空泵。
21. (可选, 浓缩 DNA) 取出洗脱板放置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱放置 30-60 分钟浓缩 DNA。
22. 倒弃结合板，在收集板上贴上封口膜，把质粒保存于 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题回答

该则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，都请联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>产量低或无产量</b>	
质粒拷贝数低；	提高菌液用量，按低拷贝数方案进行操作。
Buffer P2 有沉淀或失效	有沉淀析出，使用前需水浴使之溶解；若 Buffer P2 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。
<b>基因组 DNA 污染</b>	
动作过于剧烈	加入 Buffer P2/N3 时，必须轻柔颠倒混匀；
裂解时间过长	加入 Buffer P2 后，总时间不要超过 5 分钟，有些质粒可能不要超过 3 分钟。
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。
<b>RNA 污染</b>	
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，可能需要再加入 RNase A。
细菌密度太高	减少菌液的使用量
<b>下游实验结果不理想</b>	
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 High Pure Plasmid Mini Kit。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。