

## HiPure Plasmid/BAC EF Mini Kit

去内毒素质粒小量中提试剂盒（通用型）

### 产品组份

产品编号	P1154-01	P1154-02	P1154-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	5 mg	20 mg
Buffer P1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer LEN3	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer LN4	1.5 ml	70 ml	2 x 160 ml
Buffer PW1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer PW2*	3 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
HiPure DNA Mini Column III	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

版本号：2019-01

### 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℃。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。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8℃保存 6 个月。

## 产品简介

本产品适合于从 10~15 ml 细菌培养液中提取 10~70 $\mu$ 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 1EU/ $\mu$ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

## 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 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 6 个月。
- 短暂离心 RNase 酶管，把全部 RNase A 转移至 Buffer P1 中，于 2-8 $^{\circ}$ C 保存。
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，室温保存。
- 灭菌的 1.5ml 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。

## 实验步骤

1. 将含质粒的菌种接种于含有 10-15ml LB/抗生素培养液的培养瓶中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 小时扩增质粒。
2. 3,000-5,000  $\times$  g 离心 10 分钟，收集 10~15ml 菌体。
3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。**加入 500 $\mu$ l Buffer P1/RNase A**，高速涡旋使细菌充分重悬。  
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。
4. **加入 500 $\mu$ l Buffer P2 至重悬液中**，颠倒混匀 8~10 次。室温放置 3 分钟，其间颠倒混匀 3~5 次。
5. **加入 250 $\mu$ l Buffer LEN3 至裂解液中**，立即颠倒 10~15 次。  
加入 Buffer LEN3 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。

6. 13,000 × g 离心 10 分钟。
7. 转移 0.95ml 上清液至 2.0ml 离心管中，加入 0.95ml Buffer LN4 至上清中，颠倒混匀 3~5 次。
8. 将 HiPure DNA Mini Column III 柱套在收集管中，转移 750µl 混合液至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，转移 750µl 混合液至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。再重复一次把剩余混合液转移至柱子中离心过滤。
10. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 500µl Buffer PW1 至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 650µl Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
12. (可选)倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 650µl Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 × g 离心 2 分钟干燥柱子去除乙醇。
14. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中，加入 40~80µl Elution Buffer 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟洗脱 DNA。
15. 弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

## 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 $\mu\text{g}$ 。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 $\mu\text{g}$ 。
- **菌种问题:** 菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 养菌前最好先划线活化以稳定产量。
- **细胞未充分裂解:** 细菌须在 Buffer P1/RNase A 中充分重悬, 成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **试剂准备有误:** Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确
- **Buffer LN4 的体积:** Buffer LN4 加入量是上清液体积的 1 倍

### 2. RNA 污染

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

### 3. A260/230 偏低

本产品采用特异的溶液体系, 得到 DNA 的 A260/230 为 1.3~2.0, 与常规方法相比, 其比值会低一些, 但不影响测序、荧光定量 PCR、转染和动物注射等应用。用 Buffer PW2 进行第三次洗涤, 有利于提高 A260/230。若以上的解答还是无法解决您的问题, 请您联系我们。