

## HiPure Plasmid Maxi Kit

### 质粒大提试剂盒

本产品采用加厚硅胶大量柱，适合于从 100~200ml 细菌培养液中提取高达 1000µg 转染级质粒 DNA，纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR、标记以及常规的细胞转染等。40 分钟可以完成数个样品的抽提工作，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。

### 产品组份

产品编号	P1004-01	P1004-02	P1004-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	5 mg	20 mg	60 mg
Buffer P1	20 ml	120 ml	550 ml
Buffer P2	20 ml	120 ml	550 ml
Buffer P3	50 ml	160 ml	2 x 400 ml
平衡液 CL	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer PW1	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer	6 ml	30 ml	120 ml
HiPure DNA Maxi Column C	2	10	50
50ml Collection Tube C	2	10	50

版本：202401,P3

### 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)置于-20~-8°C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，使用前 37°C 水浴使沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 加入 0.2~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打 5~10 次让 RNase A 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 4 倍体积的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。

## 实验步骤

1. 将单克隆菌种接种于含 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 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 1L 培养瓶中加入 100~200ml 含抗生素 LB 培养液，移液器 0.1~0.2ml 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 12~14 小时。

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD<sub>600</sub> 应该在 2.0-3.0。纯化大柱最大结合力为 1000μg，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。2 x 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，按细菌生物量进行转换。处理低拷贝载体时，培养液可扩大 300ml LB 培养液，扩大碱裂解试剂的用量至：12ml Buffer P1, 12ml Buffer P2 和 17ml Buffer P3。

3. 转移 100~200ml 培养液到适合的离心管中，8,000rpm 离心 3 分钟，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入 9ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，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 9ml Buffer P2，温和上下颠倒并转动离心管 6~8 次。室温静置 3 分钟，其间颠倒混匀数次充分裂解。

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。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。若溶液未能变得清亮，可能菌体过多而裂解不彻底，下次实验减少菌体用量或增加 Buffer P1, Buffer P2 和 Buffer P3 用量。当菌液用量达 200ml 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，并轻轻振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液。

6. **加入 13ml Buffer P3 至裂解液，稍快速上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液。**  
加入 Buffer P3 后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量较多时，中和时会形成大块且紧密沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让大块沉淀团分散成较少的团块，让 Buffer P3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。
7. **8,000rpm 离心 15 分钟。**
8. **将 HiPure DNA Maxi Column C 套在收集管，转移 2.5ml Buffer CL 至柱子中，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 3 分钟。**  
Buffer CL 中含有 NaOH，可以激活柱子的吸附力。为减少离心操作，步骤 8-12 可以用负压抽滤进行过柱操作，进行负压操作时，请另外订购抽滤配件（VC2-10）。
9. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，转移 13~15ml 上清液(第 7 步)至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**  
纯化柱的最大容积为 15ml，需要分 2~3 次过柱。若离心机转子倾角较大，建议加入不超过 13ml，以防产生漏液现象。受离心机角度影响，以及大量试剂反复过柱，柱子中表层滤膜会有少量脱落，这属于正常现象，不影响提取效果。
10. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。重复第 9 步直至全部上清液都转移至柱子并离心。**
11. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 5ml Buffer PW1 至柱子中。8,000rpm 离心 3 分钟。**
12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 9ml Buffer PW2 至柱子中。8,000rpm 离心 10 分钟。**
13. **取出纯化大柱，打开盖子，室温放置 10 分钟晾干柱子滤膜。倒弃收集管中的滤液，并在吸水纸拍打让滤液完全流尽，室温放置晾干离心管中。**  
Buffer PW2 含 80%乙醇可以起用浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，50ml 离心管中可以用于第 14 步的质粒 DNA 收集。
14. **把柱子套回 50ml 收集管中，加入 0.7~1.0ml Elution Buffer 或灭菌水至膜中央，静置 2 分钟。8,000 rpm 离心 3 分钟。丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，转移至-20℃保存。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。由于滤膜存在吸水性，会有~0.15ml 洗脱液损失。洗脱体积不建议低于 0.7ml。**

## 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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，成团细菌因无法裂解会降低产量。
- **试剂准备有误：**Buffer P2 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PV2 未加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **长片段质粒 (>10kbp)：**处理长片段的质粒 DNA，将 Elution Buffer 预热至 55 $^{\circ}$ C，并重复第二次洗脱。

### 2. 基因组 DNA 污染

- **培养时间太长：**菌液培养时间需控制在 12~16 小时。
- **裂解问题：**加入 Buffer P2 时，必须轻柔颠倒混匀；处理多个样品时，从加入 Buffer P2 时算起，总时间不要超过 4 分钟。

### 3. 下游实验结果不理想

- **质粒降解：**用 end A<sup>+</sup> 的菌株如 HB101 或其它野生型菌株，含有高丰度的核酸酶，最好使用 HiPure Plasmid Plus Kits 系列。
- **膜脱落：**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。10,000  $\times$  g 离心 2 分钟后再把质粒转移至新的离心管中。