

HiPure HP Plasmid Mini Kit

转染级质粒小中提试剂盒

产品简介

本产品采用小量加厚硅胶柱，适合于从 5~15ml 细菌培养液中提取高达 80 μ g 的转染级质粒 DNA，产品填补了小量与中量质粒提取的空白，用户只需使用小型离心机就可轻松获得小中量的质粒 DNA。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR 和标记等。30 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	P1012-01	P1012-02C	P1012-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	5 mg	10 mg
Buffer P1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P3	9 ml	40 ml	200 ml
Buffer PW1	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer EVWB	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
过滤小柱 F1	10	50	250
HiPure DNA Mini Column III	10	50	250
2 ml Collection Tube	20	100	500

版本：202401

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℃。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。

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。
- 以下离心均在室温下进行，低温下离心会导致柱子堵塞。

实验步骤

1. 将含质粒的菌种接种于含 5~15ml LB/抗生素培养液的 50~100ml 培养瓶中，37℃摇床培养 12~16 小时以扩增质粒。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单菌落接种于 10~15ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37℃摇床(200-300rpm)培养 12-16 小时。培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。平板挑菌培养时，可能会存在一些菌株生长缓慢，培养过夜后可通过菌液密度或 OD600 来判断。培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。2 × YT 或 TB 培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过 6ml。2 × 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。

2. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟收集 5~15ml 菌体，倒弃废液并在吸水纸上吸尽残液。

若使用 2ml 离心管收集菌体时，于 13,000 × g 离心 1 分钟收集菌体，倒弃废液后再加入菌液离心收集直至达到要求。HiPure DNA Mini Column III 采用加厚硅胶柱，最高可吸附 80μg DNA，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。

3. 加入 500μl Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬菌体。

使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。使用 15~50ml 离心管收集菌液时，这一步转移重悬液至 2.0ml 离心管中以方便第 6 步的高速离心。

4. 往重悬液中加入 500 μ l Buffer P2, 颠倒混匀 10~15 次, 室温放置 2-3 分钟, 其间再颠倒混匀数次或直至菌体完全裂解。

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 1.5ml 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, 总裂解时间不要超过 5 分钟。

5. 加入 700 μ l Buffer P3 至裂解液中, 立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。

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。当菌液用量达 1.5ml 时, 属于高密度碱裂解类型, 中和时会形成大块且紧密的沉淀团, 混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作, 并轻轻振荡让大块沉块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。

6. 13,000 \times g 离心 5 分钟。

7. 将过滤小柱 F1 装在 2ml 收集管中, 将 HiPure DNA Mini Column III 装在收集管中。

8. 把 750 μ l 上清液(第 6 步)转移至过滤小柱 F1 中, 13,000 \times g 离心 1 分钟, 将收集管中的滤液倒入 HiPure DNA Mini Column III 中, 13,000 \times g 离心 1 分钟。倒弃 DNA 柱中的滤液, 把过滤小柱 F1 和 DNA 柱都装回收集管中。

9. 把剩余的上清液(第 6 步)转移至过滤小柱 F1 中, 13,000 \times g 离心 1 分钟。再把滤液倒入 DNA 柱子中, 13,000 \times g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液, 把 DNA 柱子套回收集管中, 加入 500 μ l Buffer PW1 至柱子中。13,000 \times g 离心 30~60 秒。

11. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 500 μ l Buffer EWB 至柱子中。13,000 \times g 离心 30~60 秒。

12. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 700 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 \times g 离心 30~60 秒。

13. 倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟甩干柱子。

14. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 50~100 μ l Elution Buffer 或灭菌水至膜中央, 静置 1 分钟, 13,000 \times g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

柱子最低的洗脱体积为 50 μ l。低于 50 μ l 会导致洗脱效率下降。50 μ l 可洗脱 60-70%的质粒 DNA。100 μ l 可洗脱出 80-85%的质粒 DNA。若需要获得最高产量，可重复第 14 步进行第二次洗脱。

15. 弃去柱子，把质粒保存于-20 $^{\circ}$ C。

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 μ 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 μ 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 DNA：**长片段质粒一般都是中低拷贝数为主，可提升菌液用量至 10ml 以提高产量。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⁺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。