HiPure Plasmid Mini Kit

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 80μg 的质粒 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。20 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	P1002-01	P1002-02	P1002-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	5 mg	10 mg
Buffer P1	5 ml	25 ml	120 ml
Buffer P2	5 ml	25 ml	120 ml
Buffer BP3	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PW1	6 ml	60 ml	140 ml
Buffer PW2*	6 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：202401,BP3

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 x YT或TB培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过6ml。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。

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拍打吸尽残液。**

   若使用2ml离心管收集菌体时,于13,000 x 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400μl 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 400μl 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 BP3用量。当菌液用量达15ml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，并轻稍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 800μl Buffer BP3至裂解液中，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。**

   加入Buffer BP3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15ml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，并轻稍振荡让大块沉块团分散成较少的团块，让Buffer BP3完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

6. **13,000 x g 离心1分钟。**

   若溶液在15~50ml离心管中，于3,000-5,000 x g离心10分钟。

7. **将HiPure DNA Mini Column III 装在收集管中。把一半体积的上清液转移至柱子中，**13,000 × g 离心 30~60 秒。

8. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中，转移剩余上清液至柱子。**13,000 × g离心30-60秒。

9. **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。

   处理富含核酸酶的菌株(end A+)如 HB101 时，不能省略此步，加入Buffer PW1至柱子后，静置2分钟后再离心。

10. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入500μl Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)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500μl Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。**13,000 × g 离心30~60 秒。

12. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**13,000 x g 离心3分钟甩干柱子。

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

    柱子最低的洗脱体积为 50μl。低于 50μl 会导致洗脱效率下降。50μl 可洗脱 60-70%的质粒 DNA。100μl可洗脱出 80-85%的质粒 DNA。若需要获得最高产量，可重复第 13 步进行第二次洗脱。

14. 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 3~16μg)。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0.5~2μg。
- **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 PW2 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 Buffer BP3 换成 Buffer P3。

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 x g 离心 2 分钟后再把质粒转移至新的离心管中。

4. 中和后离心得不到上清

- **盐析出**：加入 Buffer BP3 中和后，不能低于 20℃离心。低温时，上清会有大量的盐析出而造成堵柱。若室内温度过低，可将 Buffer BP3 平衡至 37~50℃后使用。得到的上清要尽快过柱。