

## 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 100 $\mu$ g 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。

#### 产品组分

产品编号	P1002-01	P1002-02	P1002-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	10 mg
Buffer BCL	1.2 ml	6 ml	28 ml
Buffer P1	5 ml	22 ml	110 ml
Buffer P2	5 ml	22 ml	110 ml
Buffer BP3	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PVWA	6 ml	25 ml	120 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
HiPure DNA Mini Column C6	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

版本：202601, BP3

**保存条件** 本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 室温运输和保存，长期保存(>3 个月)置于 -20 ~ -8 $^{\circ}$ C。

## 准备事项

- 加入0.5ml Buffer P1至RNase A干粉中，吸打混匀溶解RNase A，然后全部转移至Buffer P1中，若RNase A是液体的，短暂离心后转移至Buffer P1中，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。
- 低温下，Buffer P2中的SDS会析出，使用前37℃水浴使沉淀完全溶解。
- 2026年01月升级，柱子升级为HiPure DNA Mini Column C6，最高载量可达至100µg，受湿气温湿度等贮藏条件影响，吸附柱最高结合力会下降，超过生产日期8个月或发现异常时，建议激活柱子以提高柱子最高载量。实验前将吸附柱装在收集管中，加入100µl Buffer BCL至柱子滤膜上，13,000 × g离心60秒，倒弃滤液把柱子装回收集管中备用。

## 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5~15ml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拍打吸尽残液。  
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。该产品采用加厚硅胶柱，最高可吸附100µg DNA，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，高速涡旋或吸打充分重悬菌体，转移至2ml离心管中。  
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。
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。混匀后溶液应变得黏稠而透亮。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，裂解液会极为黏稠，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，并轻微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 800 $\mu$ l 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，并轻微振荡让大块沉淀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  $\times$  g 离心 5分钟。**

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

**7. 把HiPure DNA Column C6装在收集管，把一半体积上清液转移至柱子，13,000  $\times$  g 离心 60 秒。**

生产日期超过8个月时或发现异常时，使用前用100 $\mu$ l Buffer BCL激活吸附柱以提高载量。

**8. 倒弃滤液把柱子套回收集管，转移剩余上清液至柱子，13,000  $\times$  g离心60秒。**

**9. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 450 $\mu$ l Buffer PWA至柱子，13,000  $\times$  g 离心 60 秒。**

处理含核酸酶菌株(end A<sup>+</sup>, HB101)，不要省略此步，加入Buffer PWA后，静置2分钟后再离心。

**10. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 450 $\mu$ l Buffer PW2至柱子，13,000  $\times$  g 离心60 秒。**

**11. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 450 $\mu$ l Buffer PW2 至柱子，13,000  $\times$  g 离心60 秒。**

**12. 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。**

**13. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中，加入 60~100 $\mu$ l Elution Buffer 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 $\mu$ l。低于 50 $\mu$ l 会导致洗脱效率下降。50 $\mu$ l 可洗脱 60-70%的质粒 DNA。100 $\mu$ l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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ 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 PVW2 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<sup>+</sup> 的菌株如 HB101 或其他野生型菌株，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。12,000  $\times$  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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 后使用。得到的上清要尽快过柱。