

HiPure Plasmid Midi Kit

质粒中提试剂盒

产品简介

本产品采用加厚硅胶中量柱，适合于从 50~150ml 细菌培养液中提取高达 300 μ g 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。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。

产品组分

产品编号	P1003-01	P1003-02	P1003-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	50 μ l	10 mg	30 mg
Buffer BCL	1.2 ml	6 ml	30 ml
Buffer P1	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer P2	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer P3	9 ml	80 ml	2 x 200 ml
Buffer PW1	5 ml	22 ml	110 ml
Buffer PW2 *	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
HiPure DNA Midi Column C6	2	10	50
15 ml Collection Tube	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 室温运输和保存，长期保存(>3 个月)置于-20~8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。

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。
- 低温下，Buffer P2中的SDS会析出，使用前37℃水浴使沉淀完全溶解。
- 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. **将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含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，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移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，用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。

2. **在250ml培养瓶中加入50~75ml含抗生素LB培养液，接种0.1%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。生物量为150，若YT/TB培养液培养后，OD600=10，则高拷贝菌液量为15ml。

3. **转移50~75ml培养液到适合的离心管中，4,000~5,000rpm离心10分钟，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**

纯化中柱最大结合力为300µg，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。处理低拷贝载体时，菌液用量可以达到150ml LB培养液，加倍碱裂解试剂用量：5ml Buffer P1, 5ml Buffer P2和7ml Buffer P3用量，本产品提供足够试剂处理150ml菌液。

4. **加入2.5ml 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2.5ml Buffer P2至重悬液，温和地上下颠倒并转动离心管15~20次，室温静置3分钟，其间颠倒混匀6-8次。**

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 P3用量。当菌液用量达75ml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。

6. 加入 3.5ml Buffer P3 至裂解液，稍快速上下颠倒混匀10~15 次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。当菌液用量达75ml 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 P3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 4,000~5,000rpm 离心 15 分钟。

若实验室有更高速度的离心机，把中和液转移至高速离心管中，8000-12000rpm离心 10 分钟。若上清液不澄清，可订购美基小量过滤器过滤去除杂质。

8. 柱子激活：将 HiPure DNA Midi Column C6 套在 15ml 收集管中，加入 0.5ml Buffer BCL至柱子滤膜上，4,000~5,000rpm 离心 2 分钟待用。

为更方便操作，第 8-13 步可以用负压抽滤操作，负压抽滤设备可选用美基的 MagVac-20。抽滤操作时加入 0.5ml Buffer CL 至柱子中，静置 5 分钟后抽滤，然后依次加入 1ml 灭菌水，上清液，Buffer PW1，Buffer PW2 至柱子中抽滤，滤完后再加入 1ml 无水乙醇至柱子抽滤，滤完后再抽滤 15分钟干燥柱子的滤膜，按第 13 步进行操作。

9. 转移 4ml 上清液至纯化中柱 C6，4,000~5,000rpm离心 2 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管，重复这一步直至全部上清液都转移至柱子并离心。

10. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 2 ml Buffer PW1 至柱子，4,000~ 5,000rpm 离心 2 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 4 ml Buffer PW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。5,000rpm 离心 10 分钟。

取出柱子时不要让柱子的底部碰到液体，若碰到液体再离心一次。

12. 取出纯化中柱，室温放置 10 分钟晾干柱子滤膜。倒弃收集管中的废液，用灭菌水清洗收集管 1 次，倒弃后溶液晾干备用。

Buffer PW2 含 80%乙醇可以起到浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，离心管中可以用于第 13 步的质粒 DNA 收集。

13. 把柱子套在收集管中，加入 0.4 ml Elution Buffer 至柱子膜中央，静置 2 分钟，5,000 rpm 离心 2 分钟。

这一步可洗脱出60-75% DNA，若需最高浓度，省略第14步的二次洗脱或两次洗脱分开。

14. 加入 0.2 ml Elution Buffer 至柱子膜中央，静置 2 分钟，5,000 rpm 离心 2 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

由于滤膜存在吸水性且离心速度转低，约有0.1ml 洗脱液损失，进行第二次洗脱能有效洗脱出余下的质粒 DNA。处理低拷贝载体，建议第一次加入0.4ml 洗脱液离心，第二次再加入 0.2ml 新洗脱液，最后可以得到~0.5ml 洗脱液。

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 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 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。