

## HiPure Plasmid Maxi Kit

### 质粒大提试剂盒

#### 产品简介

本产品采用加厚硅胶大量柱，适合于从 100~400ml 细菌培养液中提取高达 1500µg 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                   | P1004-01 | P1004-02 | P1004-03   |
|------------------------|----------|----------|------------|
| 包装次数                   | 2 次      | 10 次     | 50 次       |
| RNase A                | 100 ul   | 10 mg    | 60 mg      |
| Buffer BCL             | 3 ml     | 12 ml    | 60 ml      |
| Buffer P1              | 25 ml    | 120 ml   | 550 ml     |
| Buffer P2              | 25 ml    | 120 ml   | 550 ml     |
| Buffer BP3             | 50 ml    | 250 ml   | 3 x 450 ml |
| Buffer PVWA            | 12 ml    | 60 ml    | 270 ml     |
| Buffer PW2*            | 6 ml     | 20 ml    | 100 ml     |
| Elution Buffer         | 6 ml     | 20 ml    | 100 ml     |
| 黄色大柱 C7                | 2        | 10       | 50         |
| 50ml Collection Tube C | 2        | 10       | 50         |

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)需要置于 20~8℃。

## 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1月升级，柱子升级为黄色大柱C7，最高载量可达到1500µg。

## 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中可能会丢失载体，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. **在适量的培养瓶中加入●200ml(高拷贝)或▲400ml(低拷贝)含抗生素LB培养液，移液器0.1%初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养14~16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)，OD600应该在2.0-3.0。纯化大柱最大结合力为1500µg，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。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。
3. **转移●200ml(高拷贝)或▲400ml(低拷贝)培养液到合适离心管中，8,000rpm离心5分钟，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**
4. **加入●7ml或▲12ml Buffer P1/RNase A至菌体，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。**  
充分重悬细菌，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●7ml或▲12ml Buffer P2，温和地上下颠倒并转动离心管15~20次，室温静置3分钟，其间颠倒混匀数次加速裂解。**  
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200ml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，并轻轻振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液。

- 加入●14 ml或▲24 ml Buffer BP3至裂解液，稍快速上下颠倒混匀10~15次或直至形成蛋白状悬浊液。

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。

- 8,000rpm 离心 10 分钟。

- 将黄色大柱 C7 套在收集管，转移 1.0 ml Buffer BCL，8,000 rpm 离心 1 分钟。

Buffer CL 中含有氢氧化钠可以激活柱子的吸附力。为减少离心操作，步骤 8-12 可以用负压抽滤操作，进行负压操作时，请另外订购抽滤配件（VC2-10）。抽滤时加入 1.0ml Buffer CL 至柱子中，静置 5 分钟后抽滤，然后依次加入 5ml 灭菌水，上清液，Buffer PWA，Buffer PW2 至柱子中抽滤，滤完后再加入 5ml 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。

- 转移~13ml 上清液(第 7 步)至柱子中，8,000rpm 离心 1 分钟，倒弃滤液把柱子套回收集管，重复这一步直至上清液都转移至柱子并离心。

纯化柱的最大容积为 13ml，需要分 3~5 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。

- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 5 ml Buffer PWA，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 1 分钟。

- 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 9 ml Buffer PW2，8,000rpm 离心 10 分钟甩干柱子。

- 取出黄色大柱 C7，打开盖子，室温放置 10~15 分钟晾干柱子滤膜。倒弃滤液，在吸水纸拍打吸尽滤液，室温放置晾干离心管。

Buffer PW2 含 80%乙醇可以起到浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，50ml 离心管中可以用于第 13 步的质粒 DNA 收集。

- 把柱子套回 50ml 收集管中，加入 0.8ml Elution Buffer 至柱子的膜中央，静置 2 分钟，8,000 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。

- 加入 0.8ml Elution Buffer 至柱子的膜中央，静置 2 分钟，8,000 rpm 离心 2 分钟。

为了提高质粒的回收效率，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，总洗脱体积不建议低于 1.0ml。

- 丢弃柱子，转移质粒至新的 2ml 离心管中，转移至-20℃保存。

## 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。10,000  $\times$  g 离心 2 分钟后再把质粒转移至新的离心管中。