

HiPure FastFilter Plasmid Midi Kit

转染级质粒中提试剂盒

产品简介

本产品采用加厚硅胶中量柱和改良的碱裂解溶液体系，适合于从 30~100ml 细菌培养液中提取高达 300µg 的转染级质粒 DNA，纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR、标记和细胞转染等。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	P1013-01	P1013-02	P1013-03
包装次数	4 次	20 次	100 次
RNase A	200 µl	10 mg	60 mg
Buffer BCL	1.2 ml	6 ml	30 ml
Buffer P1	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer P2	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer LEN3	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer GP	20 ml	90 ml	450 ml
Buffer PW1	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer EWB	10 ml	50 ml	220 ml
Buffer PW2*	10 ml	20 ml	100 ml
Elution Buffer	5 ml	30 ml	120 ml
Clear Midi Syringe B	4	20	100
HiPure DNA Midi Column C6	4	20	100
15 ml Collection Tube	4	20	100

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 0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀让 RNase A 充分溶解，然后把 RNase A 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，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。

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◆200ml 培养瓶加入 30-50ml (高拷贝) LB/抗生素培养液；或在■500ml 培养瓶中加入 50-100ml (低拷贝) LB/抗生素培养液，接种 0.001 倍初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 12-16 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，建议不要超过 15ml 或 30ml。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。
3. 3,000-5,000rpm 离心 10 分钟，收集◆30-50ml 或■50-100ml 菌液，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。
4. 加入◆2.5 ml 或■4.0 ml Buffer P1/RNase A 混合液，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◆2.5 ml 或■4.0 ml Buffer P2 至重悬液，温和地上下颠倒并转动离心管 10~15 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 LEN3 用量。
6. 加入◆1.3 ml 或■2.0 ml Buffer LEN3 至裂解液，稍快速上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液。

加入 Buffer LEN3 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 50ml/100ml 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 LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 取出过滤器(Clear Midi Syringe B)活塞，把过滤器放到 50ml 离心管或瓶子中(自备)。
8. 把第 6 步的混合液全部倒入过滤器中，然后加入◆2.5ml 或■4.0ml Buffer GP，静置 1~2 分钟让沉淀物浮到表面。把活塞插入过滤器，缓慢推动活塞使裂解液过滤到 15ml 离心管中，颠倒混匀滤液几次。
9. 柱子激活：将 HiPure DNA Midi Column C6 套在 15ml 收集管中，加入 0.5 ml Buffer BCL 至柱子滤膜上，5,000rpm 离心 2 分钟待用。
更方便操作，第 9-13 步可以用负压抽滤操作，抽滤操作时加入 0.5ml Buffer BCL 至柱子中，抽滤，然后依次加入 1ml 灭菌水，滤液，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 14 步进行操作。
10. 转移 4ml 滤液至纯化中柱 C6，5,000rpm 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。
处理 50~100ml 菌液时，这一步需要重复 3-4 次才能把全部上清过滤完毕。
11. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 2ml Buffer PW1，5,000rpm 离心 2 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子套回收集管，加入 2ml Buffer EWB，5,000rpm 离心 2 分钟。
13. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 4ml Buffer PW2，5,000 rpm 离心 10 分钟。
14. 取出纯化中柱，室温放置 10-15 分钟晾干柱子滤膜。倒弃收集管废液，在吸水纸拍打吸弃液体后，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 15 步的质粒 DNA 收集。
15. 把柱子套在收集管中，加入 0.4ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。静置 2 分钟，5,000rpm 离心 2 分钟。
这一步可洗脱出 60-75% DNA，若需最高浓度，省略第 16 步的二次洗脱或两次洗脱分开。
16. 加入 0.2ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 2 分钟，5,000rpm 离心 2 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。

建议第 14-15 步的离心速度达到或超过 5000rpm。由于滤膜存在吸水性且离心速度较低，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 3~16μg)。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 PV2 未加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。

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 × 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 LEN3 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 LEN3 平衡至 37~50℃后使用。得到的上清要尽快过柱。