

HiPure Plasmid Plus Mini Kit

野生型质粒小提试剂盒

产 品 简 介

本产品采用小量硅胶柱，适合于从 1~5ml 细菌培养液中提取高达 35 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。30 分钟可以完成数个样品的抽提工作，整个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	P1121-01	P1121-02	P1121-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	5 mg	10 mg
Lysozyme	25 mg	75 mg	350 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
Buffer P1	5 ml	25 ml	120 ml
Buffer P2	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer P3	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer PW1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer PW2*	3 ml	20 ml	50 ml
Buffer TE	1.8 ml	15 ml	60 ml
Proteinase K Solution	0.2 ml	0.6 ml	3 ml
HiPure DNA Mini Column II	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250

保存条件

本产品组份可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月) 放置于-20~8℃，收到产品Lysozyme、Proteinase K Solution保存于2~8℃。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，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，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，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- Lysozyme的配制(50mg/ml): Lysozyme以干粉提供，使用前须加入适量的Protease Dissolve Buffer 溶解，使其终浓度为50mg/ml。溶解后，分装保存于2-8℃或-20℃。

P1121-01	加入0.5 ml Protease Dissolve Buffer
P1121-02	加入 1.5 ml Protease Dissolve Buffer
P1121-03	加入7.0 ml Protease Dissolve Buffer

实验步骤

1. 13,000 × g 离心 1 分钟，收集 1~5ml 菌体，倒弃培养基，在吸水纸上拍打吸尽残液。
培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单菌落接种于1-5ml含相应抗生素的LB培养液中，37℃摇床(250-300rpm)培养12-14小时。培养管或培养瓶容量最好超过培养液体积的4-5倍。2 × YT或TB培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过2.5ml。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。处理低拷贝载体，菌液用量可以达到15ml，按1.5倍扩大 Buffer P1/P2/P3的体积。
- 2 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。
- 3 (可选:革兰氏阳性细菌)，加入25µl Lysozyme至重悬液中，颠倒混匀，室温放置15~30分钟，

其间颠倒混匀数次。

- 4 往重悬液中加入 300 μ l Buffer P2和10 μ l Proteinase K Solution，颠倒混匀 8~10 次，室温放置 10分钟，其间颠倒混匀数次。

涡旋或振荡会造成基因组污染。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。菌体较多时室温放置 2~3 分钟，其间再颠倒几次以充分裂解。

- 5 加入 500 μ l Buffer P3，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。13,000 $\times$ g 离心 10分钟。

加入 Buffer P3 后应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。

- 6 将HiPure DNA Mini Column II 装在收集管中。转移一半上清液转移至柱子中，13,000 $\times$ g 离心 30~60 秒。

离心后液体表面可能会有少量的沉淀物漂浮，转移少量沉淀物至柱子中不影响提取效果。

- 7 倒弃滤液，把柱子套回收集管，转移余下的上清液至柱子中，13,000 $\times$ g 离心30~60 秒。

- 8 倒弃滤液，把柱子套回收集管中，加入 500 μ l Buffer PW1 至柱子中，静置3分钟。13,000 $\times$ g 离心30~60 秒。

- 9 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 500 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 $\times$ g 离心 30~60 秒。

- 10 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 $\times$ g 离心 2分钟秒。

取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。

11. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l Buffer TE至柱子的膜中央，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 30 μ l。低于 30 μ l 会导致洗脱效率下降。30 μ l 可洗脱 60-70%的质粒 DNA。50 μ l可洗脱出 80-85%的质粒 DNA。若需要获得最高产量，可重复第 11 步进行第二次洗脱。

- 12 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 3~16 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, 成团的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 DNA:** 长片段质粒一般都是中低拷贝数为主, 可提升菌液用量至 10ml 以提高产量。将 Buffer TE 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

- **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。