

HiPure Plasmid Mini Kit

质粒小提中量试剂盒

产品组份

产品编号	P1002-01	P1002-02	P1002-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	5 mg	20 mg
Buffer P1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P2	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer P3	9 ml	45 ml	200 ml
Buffer PW1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
HiPure DNA Mini Column III	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

版本号：2019-01

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)放置于 -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。

产品简介

本产品采用小量硅胶柱，适合于从 5-15ml 细菌培养液中提取 20-80 μ g 质粒 DNA。该方案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中小量的质粒 DNA。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR 和标记等。30 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。

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 充分溶解，然后把 RNase A 全部转移至 Buffer P1 中，于 2-8 $^{\circ}$ C 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。
- 灭菌的 1.5ml 离心管，用于收集 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 以下离心均在室温下进行，低温下离心会导致柱子堵塞。

实验步骤

1. 将含质粒的菌种接种于含 10~15ml LB/抗生素培养液的 50ml 培养管中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 小时以扩增质粒。

2. 3,000-5,000 \times g 离心 10 分钟，收集 10~15ml 菌液。

3. 倒弃培养基，并反扣于吸水纸轻轻拍打吸尽残液。**加入 500 μ l Buffer P1/RNase A 混和液**，涡漩重悬细菌。

使用前，须确保 RNase A 已加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。

4. 把重悬液转移到 2ml 离心管中。**加入 500 μ l Buffer P2**。轻轻颠倒 8~10 次。室温放置 2 分钟，其间偶尔颠倒混匀几次。

轻轻颠倒混匀，不要涡旋，否则会引起基因组 DNA 断裂而污染。菌液用量超过 10ml 时，裂解液会很粘稠而难混匀。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。若有必要，可一直缓慢颠倒混匀至裂解液变得透

亮，但这一步操作时间不能超过 4 分钟。

5. **加入 700 μ l Buffer P3，立即颠倒混匀 15~20 次。**

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。混匀过程须轻柔。菌液用量较多时，中和会较难进行，增加颠倒次数至溶液彻底中和。

6. $\geq 13,000 \times g$ 离心 10 分钟。

7. 将 HiPure DNA Mini Column III 柱子套在收集管中。**转移一半体积的上清液至柱子中。**
13,000 $\times g$ 离心 30-60 秒。

8. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。把剩余上清液转移至柱子中。13,000 $\times g$ 离心 30-60 秒。

9. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中。**加入 500 μ l Buffer PW1 至柱子中。** 13,000 $\times g$ 离心 30-60 秒。

处理核酸酶敲除的菌株(end A-), 如 DH5⁻、JM109 等, 可省略这一步。处理富含核酸酶的菌株(end A+) 如 HB101 时, 不能省略此步。Buffer PW1 含有蛋白质变性剂, 请戴手套处理。处理含核酸酶的菌株时, 推荐使用 HiPure Plasmid Plus Kits, 以提高质粒的稳定性。

10. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中，**加入 600 μ l Buffer PW2 至柱子中。** 13,000 $\times g$ 离心 30-60 秒。

使用前 Buffer PW2 必须用无水乙醇稀释。稀释条件请按瓶子上的标签指示。

11. 倒弃流出液，把柱子套回收集管中，**加入 600 μ l Buffer PW2 至柱子中。** 13,000 $\times g$ 离心 30-60 秒。

12. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 $\times g$ 离心 2 分钟干燥柱子。

不要忽略此步。这一步为了去除残留在柱子的乙醇。

13. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。**加入 75-100 μ l Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。** 静置 2 分钟，12,000 $\times g$ 离心 1 分钟。

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 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%)。

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, 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 x 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 P3 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 P3 平衡至 37~50 $^{\circ}$ C 后使用。得到的上清要尽快过柱。