

HiPure Plasmid Micro Kit

质粒快速小提试剂盒(改良型)

产品组份

产品编号	P1001-01	P1001-02	P1001-03
包装次数	50 次	100 次	250 次
RNase A	3 mg	5 mg	10 mg
Buffer P1	15 ml	30 ml	80 ml
Buffer P2	15 ml	30 ml	80 ml
Buffer NP3	20 ml	40 ml	100 ml
Buffer PW1	30 ml	60 ml	140 ml
Buffer PW2*	10 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	6 ml	15 ml	30 ml
HiPure DNA Mini Column IV	50	100	250
2 ml Collection Tube	50	100	250

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。

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。20 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 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。
- 以下离心均在室温下进行，低温下离心会导致柱子堵塞。
- 处理低拷贝质粒，按比例扩大 Buffer P1、P2 和 NP3 用量，可处理 5~15ml 细菌培养液。

实验步骤

- 13,000 \times 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 $^{\circ}$ C 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 \times YT 或 TB 培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过 2.5ml。2 \times 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/NP3 的体积。
- 加入 250 μ l 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。
- 往重悬液中加入 250 μ l Buffer P2，颠倒混匀 8~10 次或直至菌体完全裂解。**

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。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 NP3 用量。

4 加入 350 μ l Buffer NP3, 立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。

加入 Buffer NP3 后应立即颠倒混匀, 以防止沉淀团聚而影响中和效果。

5 13,000 \times g 离心 2 分钟。

6 将 HiPure DNA Mini Column IV 装在收集管中。把上清液转移至柱子中, 13,000 \times g 离心 30~60 秒。

室温较低时, 上清液放置过程中可能会产生浑浊现象 (SDS 析出引起的), 于 37-55 $^{\circ}$ C 度温育 60-120 秒完全溶解后再过柱。

7 倒弃滤液, 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。

处理富含核酸酶的菌株 (end A+) 如 HB101 时, 不能省略此步, 加入 Buffer PW1 至柱子后, 静置 2 分钟后再离心。

8 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。

9 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。

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。

10 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30~100 μ l Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。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 10 步进行第二次洗脱。

11. 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 PVV2 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, 建议使用 P1001C, 或者将 Buffer NP3 换成 Buffer P3。

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 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 NP3 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 NP3 平衡至 37~50 $^{\circ}$ C 后使用。得到的上清要尽快过柱。