

## HiPure Plasmid/BAC EF Micro Kit

无内毒素质粒小提试剂盒（通用型）

### 产品组份

产品编号	P1153-01	P1153-02	P1153-03
包装次数	10 次	50 次	250 次
RNase A	1 mg	5 mg	10 mg
Buffer P1	6 ml	30 ml	80 ml
Buffer P2	6 ml	30 ml	80 ml
Buffer LEN3	3 ml	15 ml	40 ml
Buffer LN4	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer LN5	6 ml	30 ml	140 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 II	10	50	250
2 ml Collection Tube	10	50	250

### 保存条件

本产品可在室温（15-25℃）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

本产品适合于从 1~7.5 ml 细菌培养液中提取 2~35 $\mu$ g 低内毒素的质粒 DNA。产品采用独特的溶液体系，可处理各种质粒载体，包括常规高高中拷贝数的载体、大型载体，如 BAC，Cosmid，P1 等。DNA 产量取决于载体拷贝数和菌液量。纯化的质粒内毒素含量低于 1EU/ $\mu$ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

## 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 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 6 个月。
- 按瓶子标签所示加入乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
- 灭菌的 1.5ml 离心管，用于收集洗脱 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 高拷贝数载体：处理 1-5ml 细菌培养液，选◆方案。
- 中低拷贝数载体和大型载体(>10Kb)：处理 5-10ml 细菌培养液，选■方案。
- (可选)Blue Plus 特殊的颜色反应，有利于监控碱裂解过程。Blue Plus 可预先添加到 Buffer P1 中。由于 Blue Plus 不溶解于 Buffer P1 中，添加 Blue Plus 后，Buffer P1 会产生少量沉淀，使用前要摇匀。

## 实验步骤

1. 将含质粒的菌种接种于含有~7.5ml LB/抗生素培养液的培养管中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 小时扩增质粒。
2. 10,000  $\times$  g 离心 1 分钟，收集~7.5ml 菌体。
3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。加入 300 $\mu$ l Buffer P1/RNase A，高速涡旋充分重悬细菌。  
彻底重悬细菌对产量很关键，充分重悬后应看不到细菌团块。

4. **加入 300 $\mu$ l Buffer P2, 颠倒混匀 8~10 次。**室温放置 2 分钟, 其间颠倒混匀 1~2 次。  
颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后, 整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。
5. **加入 150 $\mu$ l Buffer LN3, 立即颠倒 10~15 次。**  
加入 Buffer LN3 后, 应立即颠倒混匀。充分混匀后, 产生的絮状沉淀最终是均一白色的。
6. 13,000  $\times$  g 离心 10 分钟。
7. **把上清液转移至新的 1.5~2.0ml 离心管中, 加入等倍体积的 Buffer LN4 至上清液中, 颠倒混匀 5~6 次。**
8. **将 HiPure DNA Mini Column II 柱套在收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
9. **倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。**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 500 $\mu$ l Buffer LN5 至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
11. **倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer PW1 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。加入 650 $\mu$ l Buffer PW2 至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
13. **倒弃滤液, 把柱子套回收集管中。**13,000  $\times$  g 离心 2 分钟干燥柱子去除乙醇。
14. **把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30~50 $\mu$ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。**静置 1 分钟, 13,000  $\times$  g 离心 1 分钟洗脱 DNA。
15. **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 $\mu$ 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, 成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **试剂准备有误:** Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 50%)。
- **Buffer LN4 的体积:** Buffer LN4 加入量是上清液体积的 1 倍。

### 2. RNA 污染

- **RNASE 失效:** Buffer P1/RNase 保存时间不要超过 6 个月。

### 3. A260/230 较低

本产品采用特异的溶液体系, 得到 DNA 的 A260/230 为 1.3~2.2, 与常规方法相比, 其比值会低一些, 但不影响测序、荧光定量 PCR、转染、动物注射等应用。用 Buffer PVX2 进行第三次洗涤, 有利于提高 A260/230。

若以上的解答还是无法解决您的问题, 请您联系我们。