

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	20 次	100 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 NP3	9 ml	40 ml	100 ml
Buffer PW1	15 ml	60 ml	140 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
HiPure DNA Mini Column IV	20	100	250
2 ml Collection Tube	20	100	250

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 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。
- 处理低拷贝质粒时，按比例扩大 Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer NP3 用量，可处理 5~10ml 细菌培养液。

实验步骤

1. 13,000 \times g 离心 1 分钟，收集 1~5ml 菌体。
- 2 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。**加入 250 μ l Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋重悬细菌。**

使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。

- 3 **往重悬液中加入 250 μ l Buffer P2，颠倒混匀 8~10 次。**

轻轻颠倒混匀。涡旋会引起基因组 DNA 污染。溶液变得粘稠而透亮表明细菌已充分裂解。如有必要，室温放置 2 分钟，其间颠倒混匀几次。处理多个样品时，这一步操作时间不要超过 4 分钟。

- 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 度温育 30-90 秒澄清后再过柱。
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。
- 8 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。**加入 600 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 (可选)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 3 分钟，按第11步进行操作。
取出柱子时，不要碰到底部的液体，若碰到液时，按第10步进行空甩以彻底去除乙醇。
- 10 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 \times g 离心 3 分钟干燥柱子。
11. 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 11 步进行第二次洗脱。
- 12 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%)。

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。