

HiPure Plasmid Micro Kit

质粒小提试剂盒(经典型)

产品组份

| 产品编号 | P1001-01C | P1001-02C | P1001-03C |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 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 P3 | 9 ml | 40 ml | 100 ml |
| Buffer PW1 | 1.5 ml | 60 ml | 140 ml |
| Buffer PW2 | 6 ml | 2 x 20 ml | 2 x 50 ml |
| Elution Buffer | 1.8 ml | 15 ml | 30 ml |
| HiPure DNA Mini Column II | 20 | 100 | 250 |
| 2 ml Collection Tube | 20 | 100 | 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℃。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。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。

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，加入适量的无水乙醇稀释 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。
- 处理低拷贝质粒时，按比例扩大 Buffer P1、Buffer P2 和 Buffer P3 的用量，可处理 5~10ml 细菌培养液。

实验步骤

1. 将含质粒的菌种接种于含 1~5ml LB/抗生素培养液的 10-20ml 培养管中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 小时。
2. 13,000 \times g 离心 1 分钟，收集 1~5ml 菌体。
3. 倒弃培养基，在吸水纸轻轻拍打吸尽残液。**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。
4. **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。
5. **加入 350 μ l Buffer P3，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。**
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. 13,000 × g 离心 10 分钟。
7. 将 HiPure DNA Mini Column II 装在收集管中。小心转移上清液至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
8. (可选) 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 500µl Buffer PW1 至柱子中。13,000 × 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。
9. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 600µl Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
10. (可选)倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 600µl Buffer PW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。13,000 × g 离心 30~60 秒。
11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。13,000 × g 离心 1 分钟干燥柱子。
12. 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30-100µl Elution Buffer 或灭菌水至柱子的膜中央。静置 1 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟洗脱 DNA。
柱子最低的洗脱体积为 30µl。低于 30µl 会导致洗脱效率下降。30µl 可洗脱 60-70%的质粒 DNA。50µl 可洗脱出 80-85%的质粒 DNA。若需要获得最高产量，可重复第 12 步进行第二次洗脱。
13. 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 Elution Buffer 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

- **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。