

HiPure Plasmid/BAC EF Mini Kit

无内质粒小中提试剂盒（通用型）

本产品适合于从 10~15 ml 细菌培养液中提取 20~100 μ g 无内毒素的质粒 DNA，产品采用独特的溶液体系，可处理各种质粒载体，包括常规高低中拷贝数的载体、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/ μ g，可直接用于细胞转染，动物注射等。

产品组份

产品编号	P1154-01	P1154-02	P1154-03
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 LEN3	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer LN4	15 ml	70 ml	2 x 160 ml
Buffer PW1	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer PW2*	3 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：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)放置于-20~8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。Buffer LN4 在存放过程会变成黄色，不同批次的 Buffer LN4 有色差是正常现象。

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 干粉充分溶解，把 RNase A 全部转移至 Buffer P1 混匀，2-8℃ 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，室温保存。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

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 50~100ml 培养瓶中，37℃ 摇床培养 12~14 小时以扩增质粒。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单菌落接种于 10~15ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37℃ 摇床(200-300rpm)培养 12-14 小时。培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。平板挑菌培养时，可能会存在一些菌株生长缓慢，培养过夜后可通过菌液密度或 OD600 来判断，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。2 × YT 或 TB 培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过 6ml。2 × 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。

2. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟收集 10~15ml 菌体，倒弃废液并在吸水纸上拍打吸尽残液。

若使用 2ml 离心管收集菌体时，于 13,000 × g 离心 1 分钟收集菌体，倒弃废液后再加入菌液离心收集直至达到菌液量的要求。HiPure DNA Mini Column III 采用加厚硅胶柱最高可吸附 80μg DNA，用户可根据质粒拷贝数调整菌液用量。

3. 加入 500μl 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。使用 15~50ml 离心管收集菌液时，这一步转移重悬液至 2.0ml 离心管中以方便第 6 步的高速离心。

4. 往重悬液中加入 500μl Buffer P2，颠倒混匀 6~8 次，室温放置 2-3 分钟，其间颠倒数次或直至菌体完全裂解。

涡旋会造成基因组污染。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。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 LEN3 用量。

当菌液用量达 15ml 时，裂解液会极为粘稠，属于高密度碱裂解类型，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过 5 分钟。

5. 加入 250 μ l Buffer LEN3 至裂解液中，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。

加入 Buffer LEN3 后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量达 15ml 时，属于高密度碱裂解类型，中和时会形成大块且紧密的沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并稍稍振荡让大块沉淀团分散成较少的团块，让 Buffer LEN3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

6. 13,000 \times g 离心 10 分钟。

7. 转移 0.95ml 上清液至 2.0ml 离心管，加入 0.95ml Buffer LN4，颠倒混匀 6~8 次。

8. 将 HiPure DNA Mini Column III 柱套在收集管中，转移 700 μ l 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 700 μ l 余下的混合液至柱子中。13,000 \times g 离心 30~60 秒。重复这一步直至所有混合液转移至柱子中并离心。

10. 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。

11. 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。

12. 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。

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。

14. 把柱子套在 1.5ml 离心管中，加入 50~100 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟洗脱 DNA。弃去柱子，把质粒保存于 -20 $^{\circ}$ C。处理大于 10Kbp 的质粒 DNA，预热 Elution Buffer 至 65 $^{\circ}$ C。把洗脱液再转移至柱子膜中央进行第二次洗脱。

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 μg 。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 μg 。
- **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
- **Buffer LN4 的体积:** Buffer LN4 加入量是上清液体积的 1 倍

2. RNA 污染

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

3. A260/230 偏低

本产品采用特异的溶液体系, 得到 DNA 的 A260/230 为 1.3~2.0, 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、转染和动物注射等应用。用 Buffer PW2 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。