

## HiPure Plasmid Midi Kit

### 质粒中提试剂盒

#### 产品简介

本产品采用加厚硅胶中量柱，适合于从 30~150ml 细菌培养液中提取高达 250 $\mu$ 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。40 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。

#### 产品组份

产品编号	P1003-01	P1003-02	P1003-03
包装次数	2 次	10 次	50 次
RNase A	1 mg	10 mg	30 mg
Buffer P1	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer P2	6 ml	60 ml	270 ml
Buffer P3	9 ml	80 ml	2 x 200 ml
Buffer PW1	6 ml	25 ml	120 ml
Buffer PW2*	6 ml	20 ml	60 ml
Elution Buffer	1.8 ml	15 ml	60 ml
HiPure DNA Midi Column III	2	10	50
15 ml Collection Tube	2	10	50

版本：202401,P3

#### 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 $^{\circ}$ 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。

## 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°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。

## 实验步骤

1. 将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10ml 培养管中，37°C 摇床培养 6~8 小时进行小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 1ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C 摇床(200-300rpm)培养 6-8 小时。甘油保存菌种在保存过程可能会丢失载体，先划平板进行活化，用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。

2. 在 250ml 培养瓶中加入 50~75ml 含抗生素 LB 培养液，移液器 50~75 $\mu$ l 初级菌液至培养瓶中，37°C 摇床培养 12~14 小时。

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。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 x 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。使用 YT 或 TB 培养液时，按细菌生物量进行转换。生物量为 150，若 YT/TB 培养液培养后，OD600=10，则高拷贝菌液量为 15ml。

3. 转移 50~75ml 培养液到适合的离心管中，3,000~5,000rpm 离心 10 分钟，倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

纯化中柱最大结合力为 250 $\mu$ g，用户可根据质粒拷贝数选择合适的菌液用量。处理低拷贝载体时，菌液用量可以达到 100~150ml LB 培养液，加倍碱裂解试剂用量至：5ml Buffer P1, 5 ml Buffer P2 和 7ml Buffer P3 用量，本产品提供足够试剂处理 100~150ml 菌液。

4. 加入 2.5ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显的菌块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。

5. 加入 2.5ml Buffer P2 至重悬液，温和地上下颠倒并转动离心管 15~20 次。室温静置 3 分钟，其间颠倒混匀 6-8 次。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的溶液而且透亮。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 P3 用量。当菌液用量达 75ml 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，并轻微振荡让菌体充分裂

解，形成均一无团块的裂解液。

**6. 加入 3.5ml Buffer P3 至裂解液，稍快速上下颠倒混匀 10~15 次或直至形成蛋花状悬浊液。**

加入 Buffer P3 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 75ml 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 P3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

**7. 4,000~5,000rpm 离心 15 分钟。**

若实验室有更高速度的离心机，把中和液转移至高速离心管中，8000-12000rpm 离心 10 分钟。可以选用 Magen Buffer NP3 代替 Buffer P3，以方便获得更澄清的上清液。

**8. 将 HiPure DNA Midi Column III 套在 15ml 收集管中，转移 4ml 上清液至柱子中。**

4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。

为更方便操作，第 8-11 步可以用负压抽滤操作，负压抽滤设备可选用美基的 MagVac-20。

**9. 倒弃滤液把柱子套回收集管，转移余下上清液至柱子。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。**

处理 100~150ml 菌液时，这一步需要重复 3-4 次才能把全部上清过滤完毕。

**10. 倒弃滤液把柱子套回收集管。加入 2ml Buffer PW1 至柱子，静置 1 分钟。4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。**

**11. 倒弃滤液，把柱子套回收集管，加入 4ml Buffer PW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。4,000~5,000rpm 离心 10 分钟。**

取出柱子时不要让柱子的底部碰到液体，若碰到液体再离心一次。

**12. 取出 HiPure DNA Midi Column III，室温放置 10 分钟晾干柱子的滤膜。倒弃收集管中的废液，用灭菌水清洗收集管 2 次，倒弃后溶液晾干备用。**

Buffer PW2 含 80%乙醇可以起用浸泡灭菌作用，倒弃滤液干燥后，离心管中可以用于第 13 步的质粒 DNA 收集。

**13. 把柱子套在收集管中，加入 0.4ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央。静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。**

**14. 加入 0.2~0.4ml Elution Buffer 或灭菌水至柱子膜中央，静置 2 分钟，4,000~5,000rpm 离心 3 分钟。弃去柱子，把质粒保存于-20℃。**

由于滤膜存在吸水性且离心速度转低，约有 0.2ml 洗脱液损失，进行第二次洗脱能有效洗脱出余下的质粒 DNA。处理低拷贝载体，建议第一次加入 0.4ml 洗脱液离心，第二次再加入 0.2ml 新洗脱液，最后可以得到~0.4ml 洗脱液。处理高拷贝载体，建议第一次加入 0.4ml 洗脱液离心，第二次再加入 0.3ml 新洗脱液，最后可以得到~0.5ml 洗脱液。

## 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3~16μg)。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0.5~2μg。
- **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 PV2 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，将 Elution Buffer 预热至 55℃，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<sup>+</sup> 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 × g 离心2分钟后再把质粒转移至新的离心管中。