

D6228 Endo-free Plasmid Mega Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确配制和保存以下试剂

- 将 RNase A 加入到 Solution I 中，保存到 4°C 中
- 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D6228-00	100mL
D6228-01	200mL
D6228-02	200mL (每瓶)

提取步骤：

1. 在 2-5L 的培养瓶中加入 0.5L LB/抗生素(50 μ g/mL)培养液中，接种 500 μ l 初级培养液，37°C 摇床培养 12-16h，以扩增质粒；
2. 取 0.5L 的菌液，4°C，5000xg 离心 10min，收集菌体；
3. 弃去培养液，反扣于吸水纸上吸尽残液，往沉淀中加入 20mL 的 Solution I/RNase A 混和液，漩涡振荡使细胞完全重新悬浮；
4. 加入 20mL Solution II，轻柔地上下颠倒混匀 10-15 次。室温静置 3-4min。此操作避免剧烈混和裂解液，且总静置时间不要超过 5min；
5. 加入 20mL Neutralization Buffer，温和颠倒 10-20 次至形成白色絮状沉淀。冰上孵育 10min，在 4°C，15,000xg 离心 20min；
6. 离心后应得到澄清的上清液，如果在上清中仍残留有飘絮物，可将相对澄清的上清转移到新的离心管，继续离心分离沉淀；
7. 转移上清至新的离心管中，加入 1/3 体积的 PFC Binding Buffer，上下颠倒混匀 10-15 次；
8. 将 HiBind[®] DNA Mega column 装入到真空抽滤装置中，转移步骤 7 中的混合液至 HiBind[®] DNA Mega column，打开真空抽滤装置，直至所有的滤液过柱完毕，关闭真空抽滤装置；
9. 向 HiBind[®] DNA Mega column 中加入 50mL PFW Wash Buffer，打开真空抽滤装置，直至所有的洗液过柱完毕，关闭真空抽滤装置；
10. 向 HiBind[®] DNA Mega column 中加入 20mL DNA Wash Buffer，打开真空抽滤装置，直至所有的洗液过柱完毕，关闭真空抽滤装置；
11. 向 HiBind[®] DNA Mega column 中加入 5mL 的无水乙醇，打开真空抽滤装置，直至所有的洗液过柱完毕，关闭真空抽滤装置；
12. 将真空抽滤装置打开至最大，空柱子抽 15min 进行干燥，关闭真空抽滤装置；
13. 将 HiBind[®] DNA Mega column 转移到 50mL 离心管中，加入 3-10mL 去内毒素

的 Elution Buffer 或水, 室温静置 5min, 室温下, 5,000xg 离心 5min; 可选重复步骤 13 再次洗脱 DNA;

14. (选做) 去除残留的纯化质粒中的内毒素:

- 1) 用洗脱缓冲液或水稀释质粒浓度至 $< 300\text{ng}/\mu\text{l}$;
- 2) 加入 0.1 倍体积的 3M NaAc, pH5.2 和 0.1 倍体积的 ETR Solution (蓝色), 上下颠倒混匀 7-10 次, 冰浴 20min, 冰浴期间将离心管取出颠倒混匀几次;
- 3) 放置到 55°C 孵育 10min, 此时裂解液变为浑浊。在 25°C, 5,000xg 离心 3min, ETR Solution 将在管底形成蓝色层;
- 4) 小心转移上层水相至 50mL 离心管 (耐受 15,000xg 离心), 加入 0.7 倍体积的异丙醇, 涡旋混匀;
- 5) 在 4°C 下, 15,000xg 离心 10min, 小心移除上清液;
- 6) 加入 10mL 70% 的乙醇洗涤 DNA, 在 4°C, 15,000xg 离心 10min, 小心移除上清, 注意不要吸到沉淀;
- 7) 空气干燥沉淀 10min, 并加入适当体积的无内毒素洗脱缓冲液溶解 DNA。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准