

D6915B Fastfilter Endo-free Plasmid Midi Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确配制和保存 Solution I, 正确稀释 DNA Wash Buffer

- 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
D6915-00B	16mL
D6915-01B	60mL
D6915-03B	160mL
D6915-04B	160mL (每瓶)

- 使用【异丙醇】对 EHBC Buffer 进行稀释, 稀释后室温保存

货号	加入量
D6915-00B	2.6mL
D6915-01B	14mL
D6915-03B	32mL
D6915-04B	65mL (每瓶)

提取步骤:

1. 将带有目的质粒的 E. coli 接种于装有 20-50 mL LB/氨苄青霉素(50 μ g/mL)培养基的 200-400mL 培养瓶中, 37°C 摇床培养 12-16 h, 以扩增质粒;
2. 吸取 20-50mL 菌液, 室温下 4,000xg 离心 10min, 收集菌体;
3. 弃培养液, 可将离心管倒置在干净的吸水纸上使培养液去除得更彻底, 往沉淀中加入 2.5 mL 的 Solution I/RNase A 混和液, 漩涡振荡使细胞完全重新悬浮。
4. 加入 2.5 mL Solution II, 轻柔地上下颠倒混匀 7-10 次。如有必要, 可把裂解液置于室温静置 3-5min;

避免剧烈震荡, 因为裂解液可能会使染色体 DNA 断裂并降低质粒纯度。(当使用完 Solution II 以后, 须盖紧其瓶盖保存好)

5. 准备一个过滤针筒, 拉出针筒中的活塞, 将针筒竖直放在一个合适的试管架上, 在注射器下端出口处放置一个离心管, 针筒开口朝上;
6. 加入 1.25mL Buffer N3, 轻柔地上下颠倒混匀离心管数次, 直至形成白色絮状沉淀。可在室温下静置孵育 2-3min。准备一个过滤针筒, 拉出针筒中的活塞, 将针筒竖直放在一个合适的试管架上, 在注射器下端出口处放置一个离心管, 针筒开口朝上。

Note: 溶液必须彻底混匀。若混合物仍然很粘稠, 呈褐色球状, 则须继续混匀, 到

溶液完全中和，溶液的完全中和对获得高产量至关重要。将 Buffer N3 预冷后再加入能更好地沉淀蛋白。

7. 准备 HiBind Midi Column，将 HiBind Midi Column 套入到 15mL 收集管中；
8. 立即将裂解液倒入过滤器的针筒中。细胞裂解液在针筒中停留 2min。白色絮状物会漂浮于裂解液表面。细胞裂解液可能已从过滤注射器口流出。用新的 50mL 试管收集裂解液。小心轻轻地将注射器活塞插入针筒中，慢慢推动活塞以使裂解液流入离心管中；

Note: 最后可能会有小部分的裂解液停留在絮状沉淀中，不要勉强将残余裂解液推出过滤器，否则会有小部分的沉淀流到收集管中。如果有沉淀流到过滤液中，离心去除沉淀。不需要使用新的 15mL 离心管收集去除的裂解液，因为在步骤 10 中也无法将的 ETR Buffer 去除干净；

另外: 可以用 4°C, 15000xg 离心 10min 去除沉淀杂质替代用过滤针筒过滤沉淀杂质。

9. 加入等体积的 ETR Binding Buffer 到裂解液中，上下颠倒混匀 7-10 次；
10. 将 HiBind[®] DNA Midi Column 套入到 15mL 收集管中，转移 3.5mL 步骤 9 中的混合液到柱子中，3,000-5,000xg 离心 3-5min，弃滤液；
11. 重复步骤 10，直至将所有的裂解液转移过柱；
12. 将 HiBind[®] DNA Midi Column 套回到 15mL 收集管中，加入 2mL ETR Wash Buffer 到 DNA Midi Column 中，按上述条件离心，弃滤液；
13. 将 HiBind[®] DNA Midi Column 套回到 15mL 收集管中，加入 3mL EHBC Buffer 到 DNA Midi Column 中，3,000-5,000xg 离心 3-5min，弃滤液；

Note: EHBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。

14. 将 HiBind[®] DNA Midi Column 套回到 15mL 收集管中，加入 3.5mL DNA Wash Buffer 到 DNA Midi Column 中，按上述条件离心，弃滤液；

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

15. 将 HiBind[®] DNA Midi Column 套回到 15mL 收集管中，加入 3.5mL DNA Wash Buffer 到 DNA Midi Column 中，按上述条件离心，弃滤液；
16. 将 HiBind[®] DNA Midi Column 套回到 15mL 收集管中，最大速度（不要超过 8,000xg）空柱子离心 10-15min 干燥；

也可按照以下方式干燥：

A. 将柱子插入到真空抽滤装置，室温下打开真空抽滤装置空柱子抽滤 15min 进行干燥，接着按照步骤 17 操作；

B. 将柱子放入到 65°C 的真空烘箱中烘 10-15min，接着按照步骤 17 操作；

17. 将 HiBind[®] DNA Midi Column 套入到新的 15mL 离心管中，加入 0.5-1mL（该体积影响到最终浓度）Endotoxin-Free Elution Buffer 中，室温静置 2-3min，最大速度（不超过 8,000xg）离心 5min 洗脱 DNA；

该过程能洗脱约 70-80% 的 DNA。可进行第二次洗脱将残留的 DNA 洗脱下，但这将导致浓度降低。或者，也可以使用第一洗脱液进行第二次洗脱以维持高 DNA 浓度。将水预热至 65°C 并让柱子室温下浸泡 2min，然后洗脱可明显提高产量。

Note: 使用该方案获得的质粒 DNA 能够做以下实验: PCR, 限制性消化, 脂质介导的转染和转化等。不同拷贝数载体的预期浓度会不同。高拷贝数质粒的浓度为 150-400ug/mL。洗脱的 DNA 可能存在一些残留的乙醇, 但不会干扰下游实验。

替代洗脱步骤获得高浓度不含乙醇的产物的操作可参考英文说明书第 7 页。

Protocol 2: Endo-Free Plasmid Midi Kit Vacuum Protocol

1. 按照 Protocol 1 的步骤 1-9 制备澄清的裂解液;
2. 按照说明书将 Midi Column 连接到真空抽滤装置;
3. 将裂解液转移到 HiBind[®] DNA Midi Column, 注意不要超过柱子的最大容量, 打开真空抽滤装置, 裂解液过柱, 关闭真空抽滤装置;
4. 加入 2mL ETR Wash Buffer 到柱子中, 打开真空抽滤装置, 洗涤过柱, 关闭真空抽滤装置;
5. 加入 3.5mL EHBC Buffer (已加异丙醇稀释) 到柱子中, 打开真空抽滤装置, 洗涤过柱, 关闭真空抽滤装置;
6. 洗涤: 加入 3.5mL DNA Wash Buffer (已加无水乙醇稀释), 打开真空抽滤装置, 洗涤过柱, 关闭真空抽滤装置;
7. 加入 3.5mL DNA Wash Buffer, 打开真空抽滤装置, 洗涤过柱, 过柱完后保持真空抽滤装置打开空柱子抽滤 10-15min 干燥柱子, 关闭真空抽滤装置;
8. 按照 Protocol 1 的步骤 17, 将 DNA 洗脱。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准