

# D6915 Endo-free Plasmid Midi Kit

## 中文简易说明

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

➤ 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
D6915-00	16mL
D6915-01	64mL
D6915-03	160mL
D6915-04	200mL (每瓶)

➤ 使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释, 稀释后室温保存

货号	加入量
D6915-00	2mL
D6915-01	10mL
D6915-03	24mL
D6915-04	50mL

➤ 在使用 Solution II 和 HBC Buffer 前观察其是否有沉淀, 若有沉淀, 可在 37°C 加热使其沉淀溶解。

### 提取步骤:

1. 将带有目的质粒的 E. coli 接种于装有 30-50 mL LB/氨苄青霉素(50μg/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. 取 30-50 mL 的菌液, 室温下 4000xg 离心 10min, 收集菌体。
3. 弃培养液, 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。

Note: 离心管倒置在干净的吸水纸上可使培养液去除得更彻底。

4. 加入 2.5 mL Solution II, 轻柔地上下颠倒混匀 8-10 次。如有必要, 可把裂解液置于室温静置 2-3min。

Note: 为避免剧烈混和裂解液, 静置时间不应超过 5min, 否则会使染色体 DNA 断裂而使得到的质粒纯度降低。静置时间延长可能导致质粒 DNA 的断裂。(当使用完 Solution II 以后, 须盖紧其瓶盖保存好)

5. 加入 1.25 mL 预冷的 N3 Buffer, 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 2min。

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。

6. 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。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 2-3min。此时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 15mL 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;

(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。)

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。

7. 加入 0.1 倍体积的 ETR Solution 至过滤裂解液中, 上下颠倒混匀 10 次, 然后冰浴静置 10min。

Note: 在加入 ETR Solution 后, 裂解液可能出现浑浊, 但冰浴后将逐渐为澄清。

8. 将上述裂解液于 42°C 水浴 5min。裂解液又将再次出现浑浊。此时于 25°C 4000xg 离心 5min, ETR 溶液将在试管底部形成蓝色分层。
9. 将上清液移至另一新的 15mL 或 50mL 试管中, 加入 0.5 倍体积无水乙醇, 轻轻上下颠倒试管 6-7 次, 室温放置 1-2min。
10. 把 HiBind® DNA Midi 结合柱套入 15mL 收集管中, 转移步骤 9 得到的 3.5 mL 混合液到 HiBind® DNA Midi 结合柱, 室温下 4,000~5,000xg 离心 3min, 弃滤液。
11. 重复步骤 10, 直至步骤 9 所得混合液全部结合到中量结合柱中。
12. 把 HiBind® DNA Midi 结合柱套入同一个收集管中, 加入 3 mL HBC Buffer 到 HiBind® DNA Midi 结合柱中, 室温下 4,000xg 离心 3min, 弃滤液。  
Note: HBC Buffer 使用前必须按说明书正确用异丙醇稀释。
13. 把 HiBind® DNA Midi 结合柱套入同一个收集管中, 加入 3.5 mL DNA Wash Buffer (用无水乙醇稀释的), 室温下 4,000xg 离心 3min, 弃滤液。  
Note: 浓缩的 DNA Wash Buffer 在使用之前必须按说明书用乙醇稀释。如果 DNA Wash Buffer 在使用之前是置于冰箱中的, 须将其拿出置于室温下。
14. 重复步骤 13。
15. 把 HiBind® DNA Midi 结合柱套入同一个收集管中, 室温下 4,000xg 离心空用 10min 以干燥结合柱基质。
16. (选做) 进一步干燥结合柱: 选择下面其中一种方法来进一步干燥结合柱, 再进行

### 洗脱 DNA

- a) 把结合柱放在真空容器中 10 min 来干燥乙醇: 室温下把结合柱移到真空室中, 连接好所有真空室的装置。密封真空室, 真空 10min。拿出结合柱, 继续下一步操作。
  - b) 在真空烘箱烘干结合柱或 65°C烘箱中烘干结合柱 10 min。继续下一步操作。
17. 把 HiBind® DNA Midi 结合柱套入一干净的 15 mL 离心管中, 加入 0.5-1 mL Endo-Free Elution Buffer 到结合柱基质上 (所加的量取决于预期终产物浓度), 室温下静置 3min;
  18. 4,000xg 离心 5 min 以洗脱出 DNA。
  19. 弃除柱子, 把 DNA 产物保存于-20°C。

### 可选洗脱质粒 DNA 方案

1. 把 HiBind® DNA Midi 结合柱套入新的干净 15 mL 离心管 (自备)。直接加入 3 mL Endo-Free Elution Buffer (或 TE Buffer) 到结合柱。室温静置 2min,  $\leq 5,000xg$  离心 5min。
2. 小心转移已洗脱的质粒到一干净的适合做沉淀的离心管。加入 130 $\mu$ l 5M NaCl 和 2.2 mL 异丙醇 (室温)。涡旋混匀, 4°C,  $>15000xg$  离心 30min。弃滤液。
3. 用 1 mL 冰冷的 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀一次,  $>15000xg$  离心 10 min。小心吸弃上清, 不要吸到沉淀物, 空气干燥质粒沉淀 10 min。
4. 最后用 200-500 $\mu$ l (由最后产品的浓度来决定) Endo-Free Elution Buffer 或 Buffer TE 溶解质粒。

### 真空操作方案

这个方案采用真空抽滤方案来提取质粒, 使用真空抽滤可大大减少离心时间, 重复倒弃滤液和加液的过程。使用前请详细阅读离心方案, 并离心方案的步骤 1-9 进行细菌的收集, 重悬, 裂解, 中和以及离心去除杂质, 以获得澄清的上清液。

1. 按照离心方案的 1-9 步, 准备好澄清的细胞裂解液。
2. 按使用说明准备好真空抽滤器, 把中量结合柱连接到抽滤器。
3. 转移细胞裂解液到中量结合柱, 小心不要超过结合柱的容积 (4mL), 用真空抽滤让裂解液通过结合柱, 转移剩下的裂解液到结合柱, 直到所有的裂解液都通过结合柱。
4. 加 3 mL HBC Buffer 到结合柱, 真空抽滤, 让液体流过结合柱。

5. 洗涤结合柱：加 3.5 mL DNA Wash Buffer（已用乙醇稀释），抽滤。
6. 重复步骤 5，再加 3.5 mL DNA Wash Buffer 洗涤结合柱，。
7. 溶液通过结合柱后再真空抽滤 10-15min。（此步是为了去除残留的乙醇）
8. 按离心方案快速洗脱步骤或可选洗脱步骤进行洗脱。

### 低拷贝数质粒方案

低拷贝数的质粒通常情况下从每毫升过夜培养的菌液中可得到 0.1-1 $\mu$ g DNA。对于从低拷贝数质粒（0.1-1 $\mu$ g/mL 培养基）或低-中量拷贝数质粒（1-2 $\mu$ g/mL）细菌中分离质粒，如有需要，可以通过改良这方法来提高产量。

开始用 50-150mL 菌液，3500-5000xg 离心 10min。进行离心操作方案步骤 3，加入两倍体积的溶液 I、II 和 III。只用一个中量结合柱继续按照前面的操作进行。无须加大 HBC Buffer 和 DNA Wash Buffer 的用量。溶液 I、II 和 III 可以单独购买。

Note：这方法不适用于高拷贝数质粒，因为超过 50mL 培养基，中量结合柱很快就会饱和。这种情况下，我们推荐把同一培养基里的样品分成多个样品处理。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准