

D6926 Endo-Free Plasmid Maxi 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.

- 将小瓶的 RNase A 加入到 Solution I 中, 并保存于 2-8°C 冰箱中。
- 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
D6926-00	48mL
D6926-01	140mL
D6926-03	180mL (每瓶)
D6926-04	216mL (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
D6926-00	6.4mL
D6926-01	20mL
D6926-03	76mL
D6926-04	64mL (每瓶)

- 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。

离心方案实验操作流程:

1. 将带有目的质粒的 E. coli 接种于装有 50-200mL LB/氨苄青霉素(50µg/mL)培养基的 1-4L 培养瓶中, 37°C 摇床培养 12-16 h, 以扩增质粒。
2. 取 50-200mL 的菌液, 于室温下 4000xg 离心 10min, 收集菌体。
3. 弃去培养基。往沉淀中加入 10mL Solution I/RNaseA 混和液, 通过移液枪吹打或者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 10mL Solution II, 盖上盖子, 轻轻上下颠倒离心管 8-10 次以获得澄清裂解物。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 5mL 预冷的 N3 Buffer, 盖好盖子, 并温和地上下颠倒离心管 10 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. 准备一个针筒过滤器，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收集管，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 5min。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 50mL 试管收集细胞裂解液。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到收集试管中。

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。

7. 加入 0.1 倍体积的 ETR Solution (蓝色) 至已流出的过滤裂解液中，颠倒试管 10 次，然后于冰浴中静置 10min。

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

8. 将上述裂解液于 42°C 下水浴 5min。裂解液又将再次出现浑浊。此时于 25°C 4,000xg 离心 5min，ETR Solution 将在试管底部形成蓝色分层。

9. 将上清液移至另一新的 50mL 试管中，加入 0.5 倍体积室温的无水乙醇，轻轻颠倒试管 6-7 次，室温放置 1-2min。

10. 将一个 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入 50mL 收集试管中，加入 20 mL 过滤液至 HiBind® DNA Maxi 结合柱中。室温下，4,000xg 离心 3min。弃滤液。

11. 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中，重复步骤 10 直至剩余的过滤液全部结合到 HiBind® DNA Maxi 结合柱中，按同样条件离心。

12. 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中，加入 10mL HBC Buffer 至 HiBind® DNA Maxi 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. 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中，加入 15mL DNA Wash Buffer (用无水乙醇稀释的)至 HiBind® DNA Maxi 结合柱中，室温下 4,000xg 离心 3min，弃去滤液。

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 洗涤缓冲液在使用之前是置于冰箱中的，须将其拿出置于室温下。

14. 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中，加入 10mL DNA Wash Buffer (用无水乙醇稀释的)至 HiBind® DNA Maxi 结合柱中，室温下 4,000xg 离心 3min，弃去滤液。

15. 最高速 (不超过 6000xg) 空甩以干燥 HiBind® DNA Maxi 结合柱的基质 10min。

16. (选做) 进一步风干 HiBind® DNA Maxi 结合柱 (可选) 选择下面其中一种方法来进一步干燥 HiBind® DNA Maxi 结合柱, 再进行洗脱 DNA (有必要的話)
 - a) 把 HiBind® DNA Maxi 结合柱放在真空容器中 15min 来干燥乙醇: 在室温下把柱子移到真空室, 连接好所有真空室的装置。密封真空室, 真空 15min。移走 HiBind® DNA Maxi 结合柱进行下一步操作。
 - b) 在真空烘箱烘干柱子或 65°C 干燥 10-15min。移走 HiBind® DNA Maxi 结合柱, 进行下一步骤操作。
17. 把 HiBind® DNA Maxi 结合柱置于一干净的 50mL 离心管上, 直接加入 1-3mL Endo-Free Elution Buffer 到 HiBind® DNA Maxi 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 5min。
18. 4,000xg 离心 5min 以洗脱出 DNA。
19. 弃除柱子, 把 DNA 产物保存于-20°C。

真空方案实验操作流程:

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. 按照离心方案步骤 1-9, 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, 把大量结合柱连接到抽滤器。
3. 转移细胞裂解液到 HiBind® DNA Maxi 结合柱, 小心不要超过 HiBind® DNA Maxi 结合柱的容积, 打开真空抽滤让样品通过结合柱, 转移剩下的裂解液到结合柱, 直到所有的样品都通过结合柱。
4. 加 10mL HBC Buffer 到 HiBind® DNA Maxi 结合柱, 打开真空抽滤, 让液体流过结合柱。
5. 加 15mL DNA Wash Buffer (已用乙醇稀释), 打开真空抽滤, 洗涤结合柱。
6. 加 10mL DNA Wash Buffer (已用乙醇稀释), 打开真空抽滤, 洗涤结合柱。
7. 溶液通过结合柱之后继续真空抽滤 10-15min。(此步是为了去除残留的乙醇)
Note: 也可以 4,000xg 离心空甩以干燥结合柱 10-15min 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 DNA。

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 μ g DNA。对于从低拷贝数质粒 (0.1-1 μ g/mL 培养基) 或低-中量拷贝数质粒 (1-2 μ 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 200-400mL 菌液, 3500-5000xg 离心 10min。进行方案 1 的步骤 3, 加入两倍体积的溶液 I、II、N3 和 ETR。只用一个 HiBind[®] DNA Maxi 结合柱继续按照前面的操作进行,。无需加大 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 200mL 培养基, 大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。

浓缩步骤:

1. 往产物中加入 1/10 体积 3M 醋酸钠 (pH5.2), 再加入 0.7 倍体积的异丙醇, 譬如转移 300 μ l 产物, 30 μ l 醋酸钠和 210 μ l 异丙醇, 涡旋混匀, 可以放置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱 1h 帮助沉淀;
2. 混匀后, 15,000xg, 4 $^{\circ}$ C 离心 20min, 收集 DNA 沉淀;
3. 小心去除上清液;
4. 加入 1-2mL 70%乙醇漂洗沉淀;
5. 15,000xg, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 收集 DNA 沉淀;
6. 小心倒掉上清液;
7. 留下 DNA 沉淀紧贴试管壁, 用 10 μ l 枪把残留液体尽可能吸走, 置于通风橱, 把抽风打开, 放置 10-15min。干燥后管壁已不带有任何液体, 且闻不到乙醇气味为干燥彻底, 否则继续置于通风橱至乙醇挥发干净;
8. 加入适量洗脱液譬如 200-500 μ l, 溶解 DNA 沉淀;
9. 把 DNA 置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准