

D6950 Endo-free Plasmid Mini Kit II 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确配制和保存以下溶液。

- 将小瓶 RNase A 加入到 Solution I, 放置在 2~8°C中保存。
- 使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释, 稀释后室温保存

| 货号 | 加入量 |
|----------|-------|
| D6950-00 | 1.2mL |
| D6950-01 | 10mL |
| D6950-02 | 32mL |

- 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 |
|----------|------|
| D6950-00 | 6mL |
| D6950-01 | 60mL |
| D6950-02 | 80mL |

- 在使用 Solution II 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. 将带有质粒的E.coli 接种于50mL LB/抗生素培养液中, 37°C摇床培养12-16 h;
2. 取10-15 mL的菌液, 室温下, 5,000xg离心10min收集细菌;
3. 倒弃培养基, 加入500μl Solution I/RNase A混和液, 漩涡振荡使细胞完全悬浮;
Note: Solution I在使用前请按说明书正确添加RNase A混匀备用。
4. 将溶液转移到新的2mL离心管, 加入500μl Solution II, 轻轻颠倒混匀, 将混合液室温放置2~3min;
Note: 加入Solution II后裂解时间不应超过5min; 密封保存。
5. 加入250μl 预冷的N3 Buffer, 轻柔上下颠倒离心管数次至形成白色絮状沉淀;
6. 室温下, 最大速度 (≥13000xg) 离心10min, 转移上清液至新1.5mL离心管中;
7. 加入上清液0.1倍体积的ETR Solution, 上下颠倒10次混匀, 冰浴10min;
Note: 加入ETR Solution后, 溶液呈现浑浊, 冰浴后变澄清。
8. 42°C孵育5min, 溶液再次变浑浊;
9. 25°C, 12,000xg离心3min, 将上层水相 (含DNA) 转移到新的1.5mL离心管中, 加入0.5倍体积的无水乙醇, 上下颠倒混匀6-7次, 室温静置1-2min;
10. 转移混合液(一次最多转移700μl) 至套有2mL收集管的HiBind® DNA 结合柱中, 室温, 10000xg离心1min, 弃滤液;

11. 重复步骤10, 直至所有混合液转移过柱;
12. 把柱子重新装回收集管, 加入500 μ l HBC Buffer, 最大速度离心1min, 弃滤液;
Note: HBC Buffer在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。
13. 把柱子重新装回收集管, 加入700 μ l DNA Wash Buffer, 最大速度离心1min, 弃滤液;
Note: DNA Wash Buffer使用前请按说明书正确添加无水乙醇稀释备用。
14. 重复步骤13;
15. 把柱子重新装回收集管, $\geq 13000xg$ 离心空柱2min干燥柱子基质;
16. 把柱子装在干净的1.5mL离心管上, 加入80-100 μ l Elution Buffer到柱子基质中, 静置1min, 最大速度离心1min洗脱DNA。
17. 弃除柱子, 把DNA产物保存于-20 $^{\circ}$ C。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准