

D6922 Plasmid Maxi Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书配制和保存以下溶液

- 将一小瓶 RNase A 加入到 Solution I 中，保存至 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
D6922-00	48mL
D6922-01	160mL
D6922-02	160mL (每瓶)

提取步骤：

1. 培养菌液：

将含有目的质粒的大肠杆菌接种到 200mL LB/氨苄青霉素 (50μg/mL) 的培养基中，置于 1-4L 培养瓶中，在 37°C 摇菌 12-16h。为获得好的效果，使用过夜培养菌株作为接种菌株。强烈建议用大肠杆菌的 endA 阴性菌株用于常规过夜质粒分离，这类菌株包括 DH5α 和 JM109；

用碱性的 SDS Solution 裂解细胞：

2. 取 100-200mL 培养细菌，在室温下，3,500-5,000xg 离心 10min；
3. 去除培养基，得到细菌沉淀，将容器壁上多余的培养基弃除。向细菌沉淀中加入 12mL Solution I/RNase A，通过涡旋或上下颠倒混匀将细菌沉淀完全重悬。完全重悬细胞沉淀对于获得良好的产量至关重要。
4. 将重悬后的细胞悬浮液转移到能够承受 12,000xg 的 50mL 离心管中(螺旋盖聚碳酸酯或 Corex 玻璃管可满足)。加入 12mL Solution II，盖上盖子，轻柔的颠倒混匀 10-15 次，必要时可在室温静置 2min；
应避免剧烈震荡混合，否则可能会将染色体 DNA 震断，并降低质粒纯度。延长孵育时间也可能导致质粒 DNA 出现切口。（Solution II 在不使用时注意将瓶盖盖紧。）
5. 加入 16mL Solution III，盖上盖子，轻柔的上下颠倒混匀数次，直至不再产生更多的白色絮状沉淀。在室温下（最好在 4°C）≥12,000xg 离心 10min 沉淀细胞碎片和基因组 DNA。

Note：缓冲液必须完全混匀。如果缓和与看起来是粘稠的，带褐色的，则需要加入更多的混合液来完全中和溶液，完全中和溶液对于获得良好的产率至关重要。提供离心速度有利于完全去除沉淀的细菌细胞物质，沉淀物的紧密堆积表明该裂解为有效裂解。

步骤 6-13 应该在离心机中进行，以获得最大的质粒 DNA 产量，且所有的离心步骤

需要在室温下进行。

6. 将 HiBind Maxi Column 套入到 50mL 收集管中, 加入 5mL Buffer GPS, 室温静置 3-10min, 室温下 3,000-5,000xg 离心 5min, 弃滤液;
7. 将 HiBind Maxi Column 套回到 50mL 收集管中, 小心转移 20mL 步骤 5 中的上清液至 HiBind Maxi Column 中, 包括可能产生的沉淀物, 注意柱子的最大容量是 20mL。在室温下, 3,000-5,000xg 离心 3-5min, 弃滤液;
8. 重复步骤 7, 直至所有上清液全部转移过柱;
9. 将 HiBind Maxi Column 套回到 50mL 收集管中, 加入 10mL Buffer HB, 该步骤确保去除残留的蛋白质, 否则会影响到下游实验提取高质量的 DNA, 离心, 弃滤液;
10. 将 HiBind Maxi Column 套回到 50mL 收集管中, 加入 15mL DNA Wash Buffer, 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。

11. 选做: 再次加入 10mL DNA Wash Buffer 洗涤。
12. 将 HiBind Maxi Column 套回到 50mL 收集管中, 最大速度 (不超过 6,000xg) 离心 10-15min 干燥柱子基质;

Note: 不要跳过该步骤, 该步骤能除去残留的乙醇, 否则将影响下游实验。

13. 干燥柱子的方法 (选做) 选择以下其中一种方法对柱子做进一步的干燥处理:
 - A. 将柱子放入到真空容器中 10min 去除乙醇, 后将柱子在室温下放入到真空室中, 使用能够连接到真空泵的装置, 密封并将真空室作抽真空处理 15min, 继续步骤 14。
 - B. 将柱子放入到真空烘箱或 65°C 烘箱中干燥 10min, 继续步骤 14。
14. 将 HiBind Maxi Column 套入到新的 50mL 离心管中, 加入 2-3mL (将决定产物浓度) Elution Buffer (或 TE Buffer), 室温静置 2min, 最大速度 (不要超过 8,000xg) 离心 2min 洗脱 DNA。该步骤能结合 60-80% 的 DNA。可选择进行第二次洗脱提高 DNA 产量, 但增加洗脱体积会降低 DNA 的浓度。或者, 可以将第一次的 Elution Buffer 吸回到柱子中进行二次洗脱以维持较高的 DNA 浓度。此外, 可在洗脱前将 Elution Buffer 在 70°C 预热再加入, 可明显提高 DNA 产量。

Note: 该方案提取的质粒 DNA 在进行 PCR、限制性消化、脂质介导的转染和转化等实验时能有良好的效果。质粒的预期浓度在不同拷贝数载体之间变化。但是高拷贝数质粒的浓度能达到 150-400µg/mL。残存的乙醇不会干扰到这些下游实验。在获得高浓度质粒后可选择以下洗脱步骤将乙醇完全去除。

柱子洗脱质粒的替代方案:

1. 将 HiBind Maxi Column 套入到新的 50mL 离心管中,加入 6mL Elution Buffer (或 TE Buffer) , 室温静置 2min, 最大速度 (不要超过 6,000xg) 离心 5min 洗脱 DNA;
2. 小心将洗脱液转移至新的离心管中, 加入 260 μ l 5M NaCl 和 4.4mL 异丙醇, 涡旋混匀后, 在 4°C, > 15,000xg 离心 30min, 小心移除上清液。
3. 用 2mL 预冷的 70%乙醇洗涤 DNA, > 15,000xg 离心 10min, 小心移除上清, 开盖空气干燥 5-10min。
4. 最后将 DNA 溶解在 200-500 μ l (决定最终浓度) Elution Buffer 或水中。

真空抽滤方案:

1. 按照提取步骤的 1-5 步进行;
2. 根据说明书, 将 HiBind Maxi Column 与真空抽滤盒连接;
3. 向 HiBind Maxi Column 中加入 5mL Buffer GPS, 室温下静置 3-10min, 打开真空泵, 直至所有溶液从 HiBind Maxi Column 通过, 关闭真空泵;
4. 转移上清液至 HiBind Maxi Column 中, 注意不要超过柱子的最大容量, 打开真空泵, 直至所有溶液从 HiBind Maxi Column 通过, 关闭真空泵;
5. 加入 10mL Buffer HB, 打开真空泵, 直至所有溶液从 HiBind Maxi Column 通过, 关闭真空泵;
6. 加入 15mL DNA Wash Buffer (已加无水乙醇稀释), 打开真空泵, 直至所有溶液从 HiBind Maxi Column 通过, 关闭真空泵;
7. 重复步骤 6, 再次加入 10mL DNA Wash Buffer 洗涤;
8. 在所有溶液通过柱子后, 保持真空泵打开 10-15min 干燥柱子;
9. 按照提取步骤 14 将 DNA 洗脱。

低拷贝数质粒提取:

低拷贝数质粒通常每 1mL 过夜培养菌液提取 0.1-1 μ g DNA。为了从低拷贝数质粒 (0.1-1 μ g/mL 培养菌液) 或低 midi 拷贝数质粒 (1-2 μ g/mL 培养菌液) 细菌中分离质粒, 可以修改该方案以在必要时提高产量。

从取 200-400mL 培养菌液开始, 在离心管中以 3,500-5,000xg 离心 10min, 按照步骤 3, 但 Solution I、II、III 的用量需翻倍, 但只需过一个 HiBind Maxi Column 即可, Buffer HB 和 DNA Wash Buffer 的用量不需要增加, Solution I、II、III 提供单独购买。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准