

D6950B 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
D6950-00B	1.6mL
D6950-01B	10mL
D6950-02B	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
D6950-00B	6mL
D6950-01B	60mL
D6950-02B	100mL

- 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 10-15mL 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. 将步骤 3 得到的细菌重悬液转移到新 2mL 离心管中, 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 (≥13,000xg) 离心 10min, 转移上清液至新 1.5mL 离心管中;
7. 加入上清液等体积的 ETR Binding Buffer, 上下颠倒混匀 10 次;
8. 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, 最大速度离心 1min, 弃滤液; 重复此步骤直至混合液全都离心过结合柱为止。
9. 把柱子重新装回收集管, 加入 500μl ETR Wash Buffer, 最大速度离心 1min, 弃去滤液;
10. 把柱子重新装回收集管, 加入 500μl HBC Buffer, 最大速度离心 1min, 弃去滤液;
Note: HBC Buffer 使用前请按说明书正确添加异丙醇。

11. 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，弃去滤液；
Note: DNA Wash Buffer使用前请按说明书正确添加乙醇稀释备用。
12. 重复第11步；
13. 把柱子重新装回收集管，最大速度离心空柱2min干燥柱子基质。
14. 把柱子装在干净的1.5mL离心管上，加入60-100 μ l Elution Buffer到柱子基质中，静置1min，最大速度离心1min洗脱DNA。
15. 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