

D6904 Plasmid Midi Kit

简易中文步骤

√实验前请按说明书正确配制和保存

- 将整管 RNase A 加入到 Solution I 的瓶中，保存到 4°C。
- 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
D6904-00	16mL
D6904-01	80mL
D6904-03	200mL
D6904-04	200mL (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 30-50mL LB/氨苄青霉素 (50μg/mL) 的培养基中，置于 0.2-0.4L 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 裂解细菌：

2. 取 30-50mL 培养菌液，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 2.5mL 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 15 或 50mL 离心管中（螺旋盖聚碳酸酯或 Corex 玻璃管可满足）。加入 2.5mL 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 3.2mL 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 Midi Column 套入到 15mL 收集管中，加入 2mL Buffer GPS，室温静置 3-10min，室温下 3,000-5,000xg 离心 5min，弃滤液；

7. 将 HiBind Midi Column 套回到 15mL 收集管中，小心转移 3.7mL 步骤 5 中的上清液至 HiBind Midi Column 中，包括可能产生的沉淀物，注意柱子的最大容量是 4mL。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 Midi Column 套回到 15mL 收集管中，加入 3mL 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 Midi Column 套回到 15mL 收集管中，加入 3.5mL 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 3.5mL DNA Wash Buffer 洗涤。

12. 将 HiBind Midi Column 套回到 15mL 收集管中，最大速度（不超过 8,000xg）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 Midi Column 套入到新的 15mL 离心管中，加入 0.5-1mL（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 5min 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。

异丙醇沉淀质粒步骤（柱子洗脱质粒的替代方案）：

1. 将 HiBind Midi Column 套入到新的 15mL 离心管中，加入 3mL Elution Buffer (或 TE Buffer)，室温静置 2min，最大速度离心 5min 洗脱 DNA；
2. 小心将洗脱液转移至新的离心管中，加入 130 μ l 5M NaCl 和 2.2mL 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 1mL 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 10-15min。
4. 最后将 DNA 溶解在 200-500 μ l（决定最终浓度）Elution Buffer 或 TE Buffer 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 Midi Column 与真空抽滤盒连接；
3. 向 HiBind Midi Column 中加入 2mL Buffer GPS，室温下静置 3-10min，打开真空泵，直至所有溶液从 HiBind Midi Column 通过，关闭真空泵；
4. 转移上清液至 HiBind Midi 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 Midi Column 通过，关闭真空泵；
5. 加入 3.0mL Buffer HB，打开真空泵，直至所有溶液从 HiBind Midi Column 通过，关闭真空泵；
6. 加入 3.5mL DNA Wash Buffer（已加无水乙醇稀释），打开真空泵，直至所有溶液从 HiBind Midi Column 通过，关闭真空泵；
7. 重复步骤 6，再次加入 3.5mL 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：

低拷贝数质粒每 1mL 过夜培养菌液通常含有 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）或略低拷贝数质粒（1-2 μ g/mL 培养菌液）细菌中分离质粒，可以使用以下方案（使用翻倍菌量进行提取）以在必要时提高产量。

取 50-100mL 培养菌液，在离心管中以 3,500-5,000xg 离心 10min，按照步骤 3，Solution I、II、III 的用量需翻倍，但只需过一个 HiBind Midi 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