

D6926B Fastfilter Endo-free Plasmid Maxi Kit 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释以下试剂

- 将 RNasee A 加入到 Solution I 中，保存到 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
D6926-00B	60mL
D6926-01B	160mL
D6926-03B	200mL (每瓶)
D6926-04B	200mL (每瓶)

- 使用【异丙醇】对 EHBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D6926-00B	9.5mL
D6926-01B	26mL
D6926-03B	110mL
D6926-04B	110mL (每瓶)

提取步骤:

Protocol 1: Endo-Free Plasmid Maxi Kit Spin Protocol

1. 将携带所需质粒的大肠杆菌接种于 1-4L 含 200mL LB/氨苄青霉素 (50μg/mL) 锥形瓶中，在 37°C 培养 12-16h;
2. 取 100-200mL 培养液，室温下 4,000xg 离心 10min，收集菌体;
3. 将培养基吸出丢弃，把离心管倒置在干净的吸水纸上待多余的液体流出，加入 10mL Solution I/RNase A，重悬细菌体，注意完全重悬。
4. 加入 10mL Solution II，轻柔地上下颠倒混匀 10-15 次，溶液变得澄清，在室温下孵育 2min;

Note: 应避免剧烈震荡，因为 Solution II 可能会使 DNA 断裂并降低质粒纯度。

5. 加入 5 mL Buffer N3，轻柔地上下颠倒混匀离心管数次，直至形成白色絮状沉淀。可在室温下静置孵育 2-3min。

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。将 Buffer N3 预冷后再加入能更好地沉淀蛋白。

6. 准备 HiBind Maxi Column，将 HiBind Maxi Column 套入到 50mL 收集管中，加入 5mL Buffer GPS，室温静置 3-10min，3,000-5,000xg 离心 5min，弃滤液;

7. 将裂解液转移到注射器针筒中，将 HiBind Maxi Column 套入到新的 50mL 收集管中，将柱塞插回到针筒中；
8. 将装有裂解液的注射器针筒放到 50mL 离心管上，轻轻插入柱塞，将裂解液排出管中，会有一些裂解液残留在絮凝的沉淀物中，不必强行将残留的裂解液排出过滤器；也可以将含有细胞碎片和 KDS 沉淀的裂解液在 4°C 下，15,000xg 离心 10min 进行沉淀，不使用注射器过滤去除沉淀。聚积的细胞碎片表明已经细胞得到充分裂解，采用交替去除沉淀可以有效提高产率，因为该方式可以收集到所有的裂解液；
9. 加入等体积的 ETR Binding Buffer 到裂解液中，上下颠倒混匀 7-10 次；
10. 将 HiBind® DNA Maxi Column 套入到 50mL 收集管中，转移步骤 9 中的混合液到柱子中，3,000-5,000xg 离心 3-5min，弃滤液；
11. 重复步骤 10，直至将所有的裂解液转移过柱；
12. 将 HiBind® DNA Maxi Column 套回到 50mL 收集管中，加入 10mL ETR Wash Buffer 到 DNA Maxi Column 中，按上述条件离心，弃滤液；
13. 将 HiBind® DNA Maxi Column 套回到 50mL 收集管中，加入 10mL EHBC Buffer 到 DNA Maxi Column 中，3,000-5,000xg 离心 3-5min，弃滤液；

Note: EHBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。

14. 将 HiBind® DNA Maxi Column 套回到 50mL 收集管中，加入 15mL DNA Wash Buffer 到 DNA Maxi Column 中，按上述条件离心，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。

15. 将 HiBind® DNA Maxi Column 套回到 50mL 收集管中，加入 10mL DNA Wash Buffer 到 DNA Maxi Column 中，按上述条件离心，弃滤液；
16. 将 HiBind® DNA Maxi Column 套回到 50mL 收集管中，最大速度（不要超过 6,000xg）空柱子离心 10-15min 干燥；

也可按照以下方式干燥：

- A. 将柱子插入到真空抽滤装置，室温下打开真空抽滤装置空柱子抽滤 15min 进行干燥，接着按照步骤 17 操作
- B. 将柱子放入到 65°C 的真空烘箱中烘 10-15min，接着按照步骤 17 操作；

17. 将 HiBind® DNA Maxi Column 套入到新的 50mL 离心管中，加入 1-3mL（该体积影响到最终浓度）Endotoxin-Free Elution Buffer（或无菌水）中，室温静置 2min，最大速度（不超过 6,000xg）离心 5min 洗脱 DNA；

该过程能洗脱约 60-80% 的 DNA。可进行第二次洗脱将残留的 DNA 洗脱下，但这将导致浓度降低。或者，也可以使用第一洗脱液进行第二次洗脱以维持高 DNA 浓度。将水预热至 70°C 并让柱子室温下浸泡 2min，然后洗脱可明显提高产量。

Note: 使用该方案获得的质粒 DNA 能够做以下实验：PCR，限制性消化，脂质介导

的转染和转化等。不同拷贝数载体的预期浓度会不同。高拷贝数质粒的浓度为 150-600ug/mL。洗脱的 DNA 可能存在一些残留的乙醇，但不会干扰下游实验。替代洗脱步骤获得高浓度不含乙醇的产物的操作可参考英文说明书第 7 页。

Protocol 2: Endo-Free Plasmid Maxi Kit Vacuum Protocol

1. 按照 Protocol 1 的步骤 1-9 制备澄清的裂解液；
2. 按照说明书将 Maxi Column 连接到真空抽滤装置；
3. 将裂解液转移到 HiBind® DNA Maxi Column，注意不要超过柱子的最大容量，打开真空抽滤装置，裂解液过柱，关闭真空抽滤装置；
4. 加入 10mL ETR Wash Buffer 到柱子中，打开真空抽滤装置，洗涤过柱，关闭真空抽滤装置；
5. 加入 10mL EHBC Buffer（已加异丙醇稀释）到柱子中，打开真空抽滤装置，洗涤过柱，关闭真空抽滤装置；
6. 洗涤：加入 15mL DNA Wash Buffer（已加无水乙醇稀释），打开真空抽滤装置，洗涤过柱，关闭真空抽滤装置；
7. 加入 10mL DNA Wash Buffer，打开真空抽滤装置，洗涤过柱，过柱完后保持真空抽滤装置打开空柱子抽滤 10-15min 干燥柱子，关闭真空抽滤装置；
8. 按照 Protocol 1 的步骤 17，将 DNA 洗脱。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准