

实验前准备

1. 使用前,将RNase A全部加入Solution I中并于4度保存。
2. 按下表用无水乙醇稀释DNA Wash Buffer, 并于室温保存。

D6926-00B: 加入60ml无水乙醇

D6926-01B: 加入160ml无水乙醇

D6926-03B: 加入200ml无水乙醇

D6926-04B: 每瓶中加入200ml无水乙醇

离心操作方案

1. 取100-200ml 菌液,3,500-5,000 x g室温离心10min收集菌体沉淀;
2. 小心去除上清液, 加10 ml Solution I /RNase A, 涡旋或用移液枪上下吹打重悬菌体;
3. 加10 ml Solution II, 来回颠倒10-15次轻柔混匀, 得到澄清的裂解液。
4. 加5 ml Buffer N3, 颠倒混匀几次直至出现白色絮状沉淀, 室温放置2-3min让其充分反应。
5. 准备结合柱——加5ml的Buffer GPS至结合柱中, 室温放置3-10min, 3,000-5,000×g离心5min, 弃滤液, 往柱子里加入10ml无菌水离心弃滤液后, 把柱子插入50ml收集管中。
6. 把第4步中获得的溶液及沉淀物全部转移至针筒式过滤器中, 室温放置2min后推压过滤器, 用一个新的50ml离心管收集滤出的清液(此步可用“15,000×g 4℃离心10min得上清”代替)。
7. 第6步获得上清液后, 加入与上清等体积的ETR Binding Buffer, 颠倒混匀7-10次。
8. 结合质粒——把准备好的结合柱插入50ml收集管, 小心转移混合液至结合柱柱里, 3,000-5,000×g离心3-5min, 弃滤液。
9. 重复第8步, 直至所有上清都过滤完, 弃滤液。
10. 加入10ml ETR Wash Buffer到结合柱上, 3,000-5,000×g离心3-5min,使全部液体滤过柱子, 弃滤液。
11. 加入10 ml Buffer EHB到结合柱上, 3,000-5,000×g离心3-5min使全部液体滤过柱子, 弃滤液;
12. 加入15 ml DNA Wash Buffer到结合柱上,3,000-5,000×g离心3-5min使全部液体滤过柱子, 弃滤液;
注意: 浓缩的DNA Wash Buffer在使用之前必须按标签的提示用无水乙醇稀释。
13. 加入10ml DNA Wash Buffer到结合柱上,3,000-5,000×g离心3-5min使全部液体滤过柱子, 弃滤液;

14. 把空柱子套回离心管，最大转速（不超过 $6,000\times g$ ）离心10—15min干燥柱子；
15. 进一步干燥柱子——把柱子转移真空抽滤装置上抽滤10min或把柱子放入65℃恒温箱10—15min
16. 把结合柱套在一个新的50ml离心管中，加入1—3ml Endotoxin-Free Elution Buffer，室温放置2—5min，最高转速离心5min洗脱质粒DNA。

备注：第一次洗脱可洗脱出60—80%结合在膜上的DNA，进行二次洗脱可洗脱出更多的DNA，提高DNA产量，但同时浓度会降低；使用预热到70℃的洗脱液可提高洗脱效率。

如需浓缩质粒DNA可参照以下操作

1. 按常规操作到第15步结束后，把结合柱套在一个新的50ml离心管中，加入6ml预热到70℃的Endotoxin-Free Elution Buffer（或无菌水），室温放置2—5min，最高转速（不超过 $6,000\times g$ ）离心5min洗脱质粒DNA；
2. 小心转移洗脱产物至一个干净的容器中进行沉淀，加入260 ul 5M NaCl和4.4ml 室温异丙醇，涡旋混匀后 $15,000\times g$ ，4℃离心30min，收集质粒DNA沉淀，小心去除上清；
3. 加入2ml 70%乙醇轻柔吸打洗涤质粒DNA沉淀后， $15,000\times g$ ，离心10min，小心倒掉上清。空气干燥5—10min至乙醇完全去除（如10min后仍有乙醇气味残留，可增加干燥时间）；
4. 用200—500ul Endotoxin-Free Elution Buffer或无菌水（洗脱体积取决于下游实验所需质粒浓度）溶解DNA