

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。

D6228-00B: 加入100ml无水乙醇

D6228-01B: 加入200ml无水乙醇

D6228-02B: 每瓶加入200ml无水乙醇

离心操作方案

1. 将带有目的质粒的E.coli 接种1-5ml LB/抗生素培养液中, 37° C摇床培养8 小时作为初级培养液; 在2-5L的培养瓶中加入0.5L LB/抗生素 (50ug/mL) 培养液中, 接种500ul初级培养液, 37° C摇床培养12-16小时
2. 取0.5L的菌液, 4℃, 5,000 x g离心10min收集细菌;
3. 倒弃培养基, 反扣于吸水纸上吸尽残液。加入20mL Solution I/RNaseA混和液, 漩涡使细胞完全悬浮;
4. 往重悬混和液中加入20mL Solution II, 轻轻颠倒混匀10-15次, 室温孵育3-4min。此操作避免剧烈混匀, 且总时间不要超过5min。
5. 加入20 mL Neutralization Buffer, 温和颠倒10-20次至形成白色絮状沉淀;
6. 4℃ 下15,000 x g离心20min。(若实验室没有高速离心管, 可选购过滤器(Lysate Clearance Maxi Syringe))
7. 转移上清液至一新的瓶子; 加1/3体积的PFC Binding Buffer, 颠倒10-15次混匀。室温静置2分钟。
举例: 若上清液体积为60ml, 则需要加入20ml PFC Binding Buffer.
8. 将 HiBind DNA Mega column插到真空抽滤装置上;
9. 将步骤7中的混合液倒入柱子中, 开启真空抽滤装置, 继续倒入混合液, 直到所有上清液滤完, 关闭真空抽滤装置;
10. 加入25mL Buffer GC到柱子中, 开启真空抽滤装置, 当液体过滤完后, 再加入25 ml Buffer GC至柱子中, 直到所有液体过滤完, 关闭真空抽滤装置;
11. 加入20mL DNA Wash Buffer, 开启真空抽滤装置, 继续加20mL DNA Wash Buffer 直至全部液体过滤完;
(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);
12. 加5ml无水乙醇到柱子基质上, 开启真空抽滤装置, 直到所有液体过滤完;

13. 保持最大抽滤压力15min, 进一步干燥柱子;
14. 把HiBind DNA Mega column转移到50ml 离心管, 室温5,000 x g离心10min干燥柱子基质;
15. 把HiBind DNA Mega column转移到新的50ml 离心管, 加3-10ml Endotoxin Free Elution Buffer或无菌水到柱子中, 室温静置5min;
16. 室温5,000 x g离心5min洗脱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。

去除内毒素

1. 用无菌水或Elution Buffer将质粒浓度稀释 < 300ng/ul;
2. 加0.1体积的3M NaAc(pH 5.2)和0.1体积的ETR Solution, 颠倒混匀7-10次, 冰浴20min, 冰浴期间颠倒混匀几次;
举例: 若稀释后质粒的总体积为10ml, 则需要加入1ml 3M NaAc, pH5.2和1ml ETR Solution.
3. 55℃孵育10min。(此时溶液会变得浑浊), 25℃ 5,000 x g离心3min;
4. 小心转移上层液到一新的50ml高速离心管中。加0.7体积的异丙醇, 涡旋混匀;
5. 4℃ 15,000xg离心10min, 弃上清;
6. 加10ml 70%乙醇洗涤DNA, 4℃ 15,000xg离心10min, 弃上清;
7. 空气干燥沉淀颗粒10min
8. 用适合体积的Endotoxin Free Elution Buffer再次溶解DNA。