

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。

D6926-01: 加入160ml无水乙醇

D6926-03: 每瓶中加入200ml无水乙醇

D6926-04: 每瓶中加入200ml无水乙醇

离心 作方案

1. 将带有质粒的E.coli 接种于100-200ml LB/抗生素培养液中, 37°C摇床培养12~16 h;
2. 取100-200ml的菌液, 室温下3,500-5,000xg离心10min收集细菌。
3. 倒弃培养基。加入10ml Solution I/RNaseA混和液, 漩涡振荡使细胞完全悬浮。
4. 往重悬混和液中加入10ml Solution II, 轻轻颠倒混匀10-15次后可将混合液室温放置2min以提高产量。避免剧烈混和裂解液且裂解反应不要超过5 min。
5. 加入5ml 冰浴Buffer N3, 并温和颠倒离心管数次至形成白色絮状沉淀。准备好过滤器。
6. 把HiBind大量柱套在收集管中, 加入5ml Buffer GPS至柱子中, 静置3-10min。室温3000-5000xg离心5分钟。去滤液, 把柱子重新放回收集管中。
7. 将裂解液倒进预先准备好的针筒过滤器中(针筒开口朝上, 下面出口处接收集管), 静置2min。
8. 插入并轻推活塞使裂解液流进下面的收集管中。
9. 在过滤澄清的裂解液中加入1/10体积的ETR, 颠倒7-10次后溶液变得浑浊, 冰浴10min。
10. 42°C水浴5min后, 25°C, 3,000-5,000xg离心5min, ETR溶液将在管底形成蓝色分层。
离心后, 如果溶液中有大量的液滴悬浮, 静置10分钟让液滴自然沉降。
11. 转移上清液移至离心管中, 加入0.5倍体积无水乙醇(室温), 混匀后室温静置1-2min。
12. 取一干净的HiBind® 大量柱装在50ml收集管中。转移20ml混合液至柱子内, 室温下3,000-5,000xg离心3-5 min, 倒去滤液。
13. 重复该第12步骤, 把剩余的过滤液转移至柱子, 直至所有的溶液都从柱子滤出。
14. 把柱子重新装回收集管, 加入10ml HB Buffer, 按上述条件离心, 弃滤液。
15. 把柱子重新装回收集管, 加入15ml DNA Wash Buffer, 按上述条件离心, 弃滤液。
16. 弃去滤液, 重复步骤15一次。
17. 弃去滤液, 把柱子重新装回收集管, 最大速度 (<6000xg) 离心10-15min以甩干柱子基质。
18. 进一步干燥柱子(可选), 将柱子从收集管中取出, 用真空抽滤装置抽干柱子10min后, 也可在真空烘箱或65°C干燥10min后重复步骤17。
19. 把柱子装在干净的50ml离心管上, 加入70°C预热的1-3ml Endotoxin free Elution Buffer 到柱子基质上(所加的量取决于预期终产物浓度), 室温下静置2min后最大速度 (<6000xg) 离心5min以洗脱DNA。

E.Z.N.A.TM EndoFree Plasmid Maxi Kit

Cat. No: D6926

简易说明书

快速流程图



重悬: 10ml Solution I
裂解: 10ml Solution II
中和: 5ml ice-cold Buffer N3

平衡柱子: 加入5ml Buffer GPS
去内毒素: 2.4ml Buffer ETR (0.1x)
结合条件: 12ml absolute ethanol (0.5x)

上柱结合 (3,000-5,000xg)

除蛋白质: 10ml Buffer HB
脱盐: 15ml DNA Wash Buffer两次

洗脱: 1-3ml Endotoxin-free Elution Buffer

订货信息

品名	菌液用量	最大结合力	货号 and 次数	价格
Endo-Free Plasmid Mini Kit I	1-5 mL	30 µg	D6948-00(5)	¥100
			D6948-01(50)	¥540
			D6948-02(200)	¥1980
Endo-Free Plasmid Mini Kit II	5-15 mL	70 µg	D6950-00(5)	¥100
			D6950-01(50)	¥675
			D6950-02(200)	¥2520
Endo-Free Plasmid Midi Kit	25-50 mL	250 µg	D6915-01(10)	¥630
			D6915-03(25)	¥1530
			D6915-04(100)	¥5670
Endo-Free Plasmid Maxi Kit	50-250 mL	1.0 mg	D6926-01(6)	¥594
			D6926-03(25)	¥2250
			D6926-04(100)	¥8820