

# D7043 HP Plasmid Mini Kit I

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书稀释和保存以下溶液

- 将小管的 RNase 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
D7043-00	8mL
D7043-01	80mL
D7043-02	80mL (每瓶)

### 提取步骤：

1. 将大肠杆菌接种到含有 5mL LB/氨苄青霉素 (50μg/mL) 培养基的 10-20mL 培养管中，在 37°C 摇菌培养 12-16h，建议采用大肠杆菌 endA 阴性菌作为常规质粒分离，此类菌株包括 DH5α 和 JM109®；
2. 吸取 1.5-5mL 菌液，在室温下 10,000xg 离心 1min，沉淀得到菌团；
3. 弃培养基。加入 250μl Solution I/RNase A，涡旋重悬，注意将菌团打散，否则可能会影响最终产量和纯度。
4. 加入 250μl Solution II 和 10μl OB protease，轻柔上下颠倒混匀 4-6 次至裂解液变澄清，可在室温下静置 10min，注意避免剧烈震荡，否则可能会剪断染色体 DNA 降低产物纯度。（Solution II 在不使用时注意拧紧瓶盖）
5. 加入 350μl Solution III，轻柔混匀数次至不再形成白色沉淀物，室温下 ≥10,000xg 离心 10min；
6. 将 HiBind™ DNA Minicolumn 套入到 2mL 收集管中，小心转移上清液至柱子中，注意不要转移到任何沉淀物。在室温下，10,000xg 离心 1min 使溶液全部通过柱子，弃滤液；
7. 将 HiBind™ DNA Minicolumn 套回到 2mL 收集管中，加入 500μl Buffer HB，10,000xg 离心 1min，弃滤液。该步骤确保除去残留的蛋白质污染，可确保下游获得高质量的产物 DNA；
8. 将 HiBind™ DNA Minicolumn 套回到 2mL 收集管中，加入 700μl DNA Wash Buffer，10,000xg 离心 1min，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。
9. (选做) 重复步骤 8，再次加入 DNA Wash Buffer 进行洗涤；
10. 将 HiBind™ DNA Minicolumn 套回到 2mL 收集管中，最大速度 (≥13,000xg) 空柱子离心 2min 干燥柱子基质，注意不要跳过此步，这对于除去残留的乙醇至关重要；
11. 将 HiBind™ DNA Minicolumn 套入到 1.5mL 离心管中，加入 30-50μl (这将决

定最终产物的浓度)无菌水(或 TE Buffer)至柱子中央基质,在室温静置 2min, 10,000xg 离心 1min 洗脱 DNA, 该操作能洗脱 70-85%的 DNA, 可选择进行第二次洗脱将残留的 DNA 洗脱下, 但会导致浓度降低。

12. DNA 的产量和质量: 确定样品在 260nm 和 280nm 处的吸光度 (稀释 20-50 倍), DNA 浓度的计算如下:

$$\text{DNA 浓度} = A_{260} \times 50 \times (\text{稀释倍数}) \mu\text{g/mL}$$

### 低拷贝质粒:

低拷贝的质粒通常每 mL 过夜培养菌液能得到 0.1-0.5 $\mu\text{g}$  DNA, 对于重组克隆的常规筛选, 5mL 培养菌液能够提取足够的产物用于琼脂糖凝胶可视化或限制性消化分析。但是也可通过修改该实验操作, 使产量基本翻倍。使用 10-15mL 的培养菌液, 每次吸取 1.5mL 菌液至 2ml 离心管, 离心收集菌体, 倒掉培养基后再次吸取 1.5mL 菌液至同一离心管继续离心, 重复该步骤至 10-15mL 菌液全部以沉淀形式收集在统一离心管内。或使用 10-15mL 菌液在 15mL 离心管内 5,000xg 离心 10min 收集菌体沉淀, 按照步骤 3 开始操作, 并将 Solution I、II、III 的用量翻倍, 将所有裂解液通过同一个 HiBind™ DNA Minicolumn, 无需增加洗涤缓冲液的体积。

Note: 对于高拷贝数的质粒, 不建议这样操作。因为大于 5mL 的培养液, HiBind™ DNA Minicolumn 会很快达到饱和的状态, 在这样的情况下, 我们建议分开处理多个样品。或者, 可以使用 E.Z.N.A.™ High performance Plasmid Mini Kit II (货号: D7045), EaZy 核酸新产品, 该产品允许使用小提柱子提取 10-15mL 培养液, 对于高拷贝数的质粒产量可以高达 70 $\mu\text{g}$ 。

### 真空抽滤方案:

按照前面步骤 (步骤 1-5) 进行细胞培养、裂解和中和, 后按照下列步骤进行。

Note: 在开始前请仔细阅读前面步骤。

1. 按照说明书准备真空抽滤盒, 将柱子与真空抽滤盒相连;
2. 将步骤 5 中的上清液转移到柱子中;
3. 打开真空泵, 使所有样品裂解液从柱子通过, 然后将剩余的裂解液继续转移到柱子中, 直至所有裂解液都转移过柱, 关闭真空泵;
4. 加入 500 $\mu\text{l}$  HB Buffer, 打开真空泵, 直至所有滤液通过柱子, 关闭真空泵;
5. 加入 700 $\mu\text{l}$  DNA Wash Buffer (已加无水乙醇稀释), 打开真空泵, 直至所有滤液通过柱子, 关闭真空泵, 重复该步骤再次加入 700 $\mu\text{l}$  DNA Wash Buffer 洗涤;
6. 将柱子从真空抽滤盒上取下, 套入到 2mL 收集管中, 最大速度 ( $\geq 13,000\text{xg}$ ) 空柱子离心 2min 干燥柱子基质;

7. 将柱子套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 30-50 $\mu$ l TE Buffer 或水，室温静置 1-2min，离心 1min 洗脱 DNA。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准