

## D6945 Plasmid Mini Kit II

### 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确配制和保存 Solution I

正确稀释 DNA Wash Buffer.

- 将小瓶的 RNase A 加入到 Solution I 中，并保存于 2-8°C 冰箱中。
- 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        |
|----------|------------|
| D6945-00 | 6mL        |
| D6945-01 | 60mL       |
| D6945-02 | 120mL (每瓶) |

- 使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

| 货号       | 加入量   |
|----------|-------|
| D6945-00 | 1.6mL |
| D6945-01 | 8mL   |
| D6945-02 | 32mL  |

- 在使用 Solution II 和 Solution III 前观察其是否有沉淀，若有沉淀，可在 37°C 加热使其沉淀溶解。

#### 提取步骤：

1. 从新划线的选择性平板中分离单个菌落，并接种到含有选择性抗生素的 10-15mL (50µg/mL) LB 培养基中，37°C 摇床 (约 300rpm) 培养 12~16 h，使用体积至少为培养基体积 4 倍的培养器皿，建议将大肠杆菌 end A 阴性菌株用于常规质粒提取，此类菌株通常包括 DH5α 和 JM109；
2. 室温下 5,000xg 离心 10min 收集细菌菌体，弃培养基；
3. 加入 500µl Solution I/RNaseA 混和液，漩涡振荡使细胞完全重悬，完全重悬对于获得良好提取结果至关重要；

Note: Solution I 在使用前必须按照说明书加入 RNase A。

4. 将上清液转移到新的 2mL 离心管中，加入 500µl Solution II，轻轻颠倒混匀数次，若有必要可静置 2-3min。

Note: 此操作避免剧烈混匀裂解液，否则可能会将染色体 DNA 剪断。裂解反应不要超过 5 min。Solution II 在存放时注意拧紧瓶盖，避免被空气中 CO<sub>2</sub> 酸化。

5. 加入 700µl Solution III，温和颠倒数次至形成白色絮状沉淀。

Note: 在加入 Solution III 后应立即将溶液彻底混匀，避免只有局部出现沉淀。

6. 室温下，最大速度 (≥13,000xg) 离心 10min。

7. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 套入到 2mL 收集管中；  
(选做) 柱平衡实验：
  - 1) 加入 100 $\mu$ l 3M NaOH 至 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 中；
  - 2) 最大速度离心 30-60s；
  - 3) 弃滤液，将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 重新套回到 2mL 收集管中。
8. 转移 700 $\mu$ l 上清液至 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 中，注意不要转移到沉淀物，室温下最大速度离心 1 min，弃滤液；
9. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管中，重复步骤 8，直至将所有上清液转移过柱；
10. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 $\mu$ l HBC Buffer，室温下最大速度离心 1 min，弃滤液。  
Note: HBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。
11. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管中，加入 700 $\mu$ l DNA Wash Buffer，室温下最大速度离心 1 min，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。
12. (可选)重复步骤 11，再次加入 DNA Wash Buffer 洗涤。
13. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 套回到 2mL 收集管中，最大速度离心空柱 2min 以甩干柱子基质。
14. 将 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 80-100 $\mu$ l Elution Buffer 到柱子基质中，静置 1min，最大速度离心 1min 洗脱出 DNA。  
Note: 从 HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Column 上洗脱 DNA 的效率取决于 pH 值。如果使用无菌去离子水洗脱，请确保 pH 值约为 8.5。一次洗脱大约 70%的 DNA，可选将残留的 DNA 进行二次洗脱，但会降低产物浓度。
15. 将洗脱的 DNA 保存在-20 $^{\circ}$ C。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准