

HiPure Plasmid 96 Kit

96孔板质粒提取试剂

产品简介

本产品采用96孔硅胶板和改良碱裂解溶液体系，适合于从 1~5ml 细菌培养液中提取高达 30 μ g 的质粒 DNA，纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR 和标记等。50 分钟可以完成数个样品的抽提工作，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。

产品组份

Cat.No.	P1005-01	P1005-02	P1005-03
Package	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
RNase A	5 mg	20 mg	50 mg
Buffer P1	25 ml	100 ml	450 ml
Buffer P2	25 ml	100 ml	450 ml
Buffer BP3	50 ml	180 ml	2 x 500 ml
Buffer PW1	60 ml	220 ml	3 x 400 ml
Buffer PW2*	50 ml	2 x 50 ml	4 x 100 ml
Elution Buffer	15 ml	60 ml	250 ml
HiPure DNA Plate	1	4	20
0.5ml Collection Plate	1	4	20
1.6ml Collection Plate	1	4	20

版本：202401, BP3

保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)置于 20~8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成，使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。

准备条件

- 加入0.5~1ml Buffer P1至RNase A干粉中，吸打混匀3~5次让RNase A干粉充分溶解，把RNase A全部转移至Buffer P1中，于2-8℃保存。
- 按瓶子标签所示，加入无水乙醇至Buffer PW2瓶子中于室温保存。
- 桶状水平式离心机，离心力大于2,500 × g。
- 封口膜

实验步骤

1. 在96孔2.2ml深孔板(自配)中，加入1.3ml培养液，接种单克隆菌斑，贴上透气封口膜，37℃，220~280rpm摇床培养20~24小时扩增质粒。
2. 2,500~4,000 × g离心10分钟收集菌体，撕弃封口膜，倒弃培养液，反扣于吸水纸上拍打几下以吸尽残液。
3. 每孔中加入200µl Buffer P1/RNase A混和液，最高速度涡旋或吸打重悬细菌。
使用前，须确保RNase A已加到Buffer P1中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的，重悬后应看不到细胞团块。若有96孔板涡旋仪如IKA MS3等，最高速度涡旋3-5次。
4. 每孔中加入200µl Buffer P2，贴上封口膜，温和地上下颠倒混匀10-15次，短暂离心收集孔口的液滴，室温放置2分钟。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等，300~600rpm低速振荡3~5分钟。
5. 撕去封口膜，每孔加入400µl Buffer BP3，贴上封口膜，立即温和地上下颠倒混匀10-15次。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等，300~600rpm低速振荡5分钟。
6. 3,000~4,000 × g离心10分钟。

离心操作

7. 把HiPure DNA Plate放在1.6ml收集板上,转移上清液至DNA板的孔中。3,000~4,000 × g离心3分钟。
转移少量的沉淀物不影响产量和纯度。

8. 倒弃滤液，把结合板放回收集板，每孔加入500 μ l Buffer PW1。3,000~4,000 \times g 离心3分钟。
9. 倒弃滤液，把结合板放回收集板，每孔加入700 μ l Buffer PW2。3,000~4,000 \times g 离心3分钟。
10. 倒弃滤液，把结合板放回收集板，每孔加入700 μ l 80%乙醇。3,000~4,000 \times g 离心3分钟。
11. 倒弃滤液，把结合板放回收集板上，最大速度(~4,000 \times g) 离心10分钟。
12. (可选) 取出结合板放置于55 $^{\circ}$ C烘箱，干燥10分钟。
13. 取下结合板放置于500 μ l收集板上。每孔中加入70-120 μ l Elution Buffer或灭菌水至结合板的膜中央。放置2分钟。最大速度(~4,000 \times g)离心5分钟。
(可选, 浓缩DNA) 取出洗脱板放置于55 $^{\circ}$ C烘箱放置20-60分钟浓缩DNA。
14. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C。

负压抽滤操作

7. 把废液收集槽放在真空抽滤盒的底部的内槽中。盖上真空抽滤盒上盖，把HiPure DNA Plate放在上盖的内槽中。
8. 连接好真空泵和抽滤盒，把第6步获得的上清液转移至结合板中。打开真空泵，压紧结合板。当压力开始上升，松开手，抽滤2分钟。
转移少量的沉淀物不影响产量和纯度。
9. 关闭真空泵，当压力降至零度时，每孔中加入500 μ l Buffer PW1，抽滤2分钟。
10. 关闭真空泵，当压力降至零度时，每孔中加入800 μ l Buffer PW2，抽滤2分钟。
11. 关闭真空泵，当压力降至零度时，每孔中加入800 μ l 80%乙醇，抽滤5分钟。
12. 关闭真空泵，当压力降至零度时，取下结合板，在一叠吸水纸上用力垂直拍打7-8次使孔壁的液滴流出。
13. 把结合板重新放回抽滤盒中。打开真空泵，继续抽滤10~15分钟。
14. (可选)取出结合板放置于55 $^{\circ}$ C烘箱，干燥10分钟。

15. 移开抽滤盒的上盖，倒弃废液槽中的液体。把500 μ l收集板放在抽滤盒的内槽中，盖上抽滤盒的上盖，调整结合板的位置，使之结合板底部的每个突出部分都插入收集板。
16. **加入100~150 μ l Elution Buffer或灭菌水至结合板的膜中央，静置2分钟。**打开真空泵抽滤3分钟，关闭真空泵。
17. (可选, 浓缩DNA) 取出洗脱板放置于55 $^{\circ}$ C烘箱放置20-60分钟浓缩DNA。
18. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C。