

HiPure FastFilter Plasmid 96 Kit

96孔质粒试剂盒(含过滤板)

产品简介

本产品采用96孔硅胶板、碱裂解溶液体系以及过滤板，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.	P1006-01	P1006-02	P1006-03
Package	1 x 96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
RNase A *	5 mg	20 mg	60 mg
Buffer P1	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer P2	30 ml	120 ml	550 ml
Buffer P3	40 ml	170 ml	2 x 400 ml
Buffer PW1	60 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer PW2*	30 ml	2 x 50 ml	4 x 100 ml
Elution Buffer	20 ml	120 ml	400 ml
HiPure DNA Plate	1	4	20
Clear Plate	1	4	20
1.6ml Collection Plate	1	4	20
0.5ml Collection Plate	1	4	20

版本：202401,P3

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1.0~1.3ml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，把96孔板反扣于吸水纸上，轻轻拍打几下以吸尽残液。
3. 每孔中加入250µl 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250µl 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350µl Buffer P3，贴上封口膜，立即温和地上下颠倒混匀10-15次，短暂离心收集孔口的液滴。
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5分钟。

离心操作

7. 取Clear Plate放置于1.6ml Collection Plate上，把上清液（第6步）或混合液（第5步）转移至Clear Plate中，3,000~4,000 × g 离心3分钟。
使用8道1ml移液枪来转移溶液。多数的沉淀会粘附在孔底上。沉淀不含质粒，无需转移。转移沉淀物不会影响过滤效果。

8. **丢弃过滤板**，把第7步获得的滤液全部转移至HiPure DNA Plate中，并把HiPure DNA Plate放回收集板中，3,000~4,000 x g 离心3分钟。
若离心机的转子适合，可以将Clear Plate放置在HiPure DNA Plate上，然后再一起放置到合适收集板或废液盒，把第6步上清液全部转移至过滤板中。2,500 x g离心5分钟。
9. **倒弃滤液**，把结合板放回收集板上，每孔中加入500µl Buffer PW1。3,000~4,000 x g 离心3分钟。
处理end A-的菌株，如DH5a和JM109时，可省略这一步。处理富含核酸酶(end A+)菌株时，如HB101，不能省略这一步，否则残留的核酸酶会降解质粒。
10. **倒弃滤液**，把结合板放回收集板，加入700µl Buffer PW2。3,000~4,000 x g 离心3分钟。
11. **倒弃滤液**，把结合板放回收集板，加入700µl 80%乙醇。3,000~4,000 x g 离心3分钟。
12. **倒弃滤液**，把结合板放回收集板，最大速度(~4,000 x g) 离心10分钟。
13. (可选) 取出结合板放置于55℃烘箱干燥10分钟。
14. 取下结合板放置于500µl收集板上，每孔中加入70~100µl 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 x g)离心5分钟。
15. (可选, 浓缩DNA) 取出洗脱板放置于55℃烘箱放置20-60分钟浓缩DNA。
16. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于4℃或-20℃。

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。把HiPure DNA Plate放置在废液收集槽上。盖上真空抽滤盒的上盖。
8. 把Clear Plate放在上盖的内槽中。调整Clear Plate的位置，使其的出口插到HiPure DNA Plate对应的孔中。连接好真空泵和真空抽滤盒。
9. **把第6步的上清液或第5步的中和液全部转移至Clear Plate中**，打开真空泵，抽滤5分钟。
用手压紧Clear Plate，当压力开始上升后，松开手。此时压力会缓慢上升到一定压力，溶液会过滤到HiPure DNA Plate中。
10. 关闭真空泵，当压力降至零时。丢弃Clear Plate。移开抽滤盒的上盖。

11. 取出HiPure DNA Plate放在抽滤盒的上盖内槽中，盖上抽滤盒的上盖。打开真空泵，抽滤3分钟。
12. 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。
13. 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。
14. 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。
15. 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。
16. 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。
17. (可选)取出结合板放置于55 $^{\circ}$ C烘箱，干燥10分钟。
18. 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。
19. 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。
20. (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。
21. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C。