无内毒素质粒小量 I 型提取试剂盒

E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid DNA Mini Kit I

货号	D6948-00	D6948-01	D6948-02	D6948-03
反应次数	5 次	50 次	200 次	500 次
HiBind® DNA Mini Columns	5 个	50 个	200 个	500 个
2 mL Collection Tubes	5 个	50 个	200 个	500 个
Solution I	5 mL	20 mL	60 mL	150 mL
Solution II	5 mL	20 mL	60 mL	150 mL
N3 Buffer	2.5 mL	10 mL	30 mL	75 mL
ETR Solution	1 mL	5 mL	20 mL	50 mL
HBC Buffer	3 mL	25 mL	80 mL	2 x 100 mL
DNA Wash Buffer	2 mL	15 mL	3 x 20 mL	4 x 40 mL
RNase A	Pre-added	100 µl	400 µl	1 mL
Endo-free Elution Buffer	5 mL	10 mL	30 mL	75 mL
User Manual	✓	✓	✓	✓

★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. 收到试剂盒后，请把 RNase A 置于-20℃作长期保存；
3. 一管 RNase A 对应加入到一瓶 Solution I 后请置于 2-8℃保存；
4. 收到试剂盒后，请把 ETR Solution 置于 2-8℃作长期保存；
5. Solution II 在不使用时，请务必拧紧瓶盖，避免长时间暴露于空气中；
6. 当贮存温度较低时，HBC Buffer、Solution II 及 N3 Buffer 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37℃中至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
7. 本试剂盒仅限科学研究使用。

★ 实验前准备

1. 将整管 RNase A 加入到 Solution I 瓶内，混匀后 2-8℃保存；
2. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后均置于室温保存。

货号	DNA Wash Buffer 稀释 无水乙醇 加入量	HBC Buffer 稀释 异丙醇 加入量
D6948-00	8 mL	1.2 mL
D6948-01	60 mL	10 mL
D6948-02	80 mL（每瓶）	32 mL
D6948-03	160 mL（每瓶）	40 mL（每瓶）

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 无水乙醇、异丙醇
- ✓ 离心速度可达 13,000xg 的小型离心机、涡旋仪、冰浴盒、培养管
- ✓ 温度可达 42℃、70℃的孵育装置
- ✓ 无菌无酶的 1.5mL 或 2mL 离心管
- ✓ （可选）无菌水、3M NaOH

★ 提取步骤 —— 离心方案

1. 取 1-5 mL LB 培养基培养过夜的菌液，室温下 10,000xg 离心 1min，收集菌体；
   # 注意：最佳菌液取用量取决于培养密度和质粒拷贝数，培养菌液的 OD600 为 2.0-3.0。若使用过量的菌液，结合膜有可能发生过载情况。
2. 弃培养液，往沉淀中加入 250 μl 的 Solution I/RNase A 混合液，漩涡振荡或吸打混匀使细胞完全重新悬浮；
   # 注意：Solution I 使用前必须加入 RNase A。
3. 加入 250 μl Solution II，轻柔地上下颠倒混匀 8-10 次。如有必要，可把裂解液置于室温静置 2-3min；
   # 注意：避免剧烈混合裂解液，静置时间不应超过 5min，否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低。静置时间过长可能导致质粒 DNA 断裂（当使用完 Solution II 以后，须盖紧瓶盖保存）。

4. 加入 125 μl 预冷的 N3 Buffer，轻柔地上下颠倒混匀离心管数次，直至形成白色絮状沉淀。

   # 注意：溶液必须彻底混匀。若混合物仍然很粘稠或呈褐色呈块状，则须继续混匀，到溶液完全中和，溶液的完全中和对获得高产量至关重要。

5. 室温下 13,000xg 离心 10min；
6. 转移上清液至新的 1.5 mL 离心管，估算上清液体积，加入 0.1 倍上清液体积的 ETR Solution 至裂解清液中，上下颠倒混匀 10 次，然后冰浴静置 10min；

   # 注意：在加入 ETR Solution 后，裂解液可能出现浑浊，但冰浴后将逐渐变澄清。

7. 将上述裂解液于 42℃水浴 5min。裂解液又将再次出现浑浊。此时于 25℃ 下，12,000xg 离心 3min，ETR Solution 将在试管底部形成蓝色分层；
8. 将上清液移至另一新的 2 mL 试管中，加入 0.5 倍上清体积无水乙醇，轻轻上下颠倒试管 6-7 次，室温放置 1-2min；
9. 把 HiBind® DNA Mini Columns 套入 2 mL 收集管中；

   # 可选柱平衡处理：

   1）往空的 HiBind® DNA Mini Columns 内加入 100 μl 3M NaOH；

   2）12,000xg 离心 1min，弃除滤液。

10. 转移不超过 700 μl 混合液至 HiBind® DNA Mini Columns，室温下 12,000xg 离心 1min，弃滤液；
11. 重复步骤 10，直至步骤 8 所得混合液全部结合到 HiBind® DNA Mini Column；
12. 把 HiBind® DNA Mini Columns 套入同一个收集管中，加入 500 μl HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释）到 HiBind® DNA Mini Columns 中，室温下 12,000xg 离心 1min，弃滤液；

    # 注意：HBC Buffer 使用前必须按说明书用异丙醇正确稀释。

13. 把 HiBind® DNA Mini Columns 套入同一个收集管中，加入 700 μl DNA Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释)，室温下 12,000xg 离心 1min，弃滤液；

    # 注意：DNA Wash Buffer 使用前必须按说明书用无水乙醇正确稀释。

14. 重复步骤 13 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤；
15. 把 HiBind® DNA Mini Columns 套入同一个收集管中，室温下 12,000xg 离心空甩 2min 以干燥结合柱基质；

16. 把 HiBind® DNA Mini Columns 套入一干净的 1.5 mL 收集管中，加入 30-100 µl Endo-Free Elution Buffer 到结合柱基质上，室温下静置 1 min；
17. 12,000xg 离心 1 min 以洗脱出 DNA；

    # 注意：首次洗脱可获得 70%的质粒 DNA，可按照实际需求进行二次洗脱。

    - 用新的 Endo-Free Elution Buffer 进行二次洗脱（可增加产量，但会导致浓度降低）
    - 将第一次洗脱出的 Endo-Free Elution Buffer 重新加回到柱子中进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）
18. 弃除结合柱，把 DNA 产物保存于-20℃。

★ 纯化方案——从其它质粒中纯化得到无内毒素质粒的操作方案

1. 将质粒的体积用 Endo-Free Elution Buffer 稀释到 300µl；
2. 加入 150µl 的 N3 Buffer，颠倒 10 次混匀；
3. 加入 45µl 的 ETR Solution 至裂解清液中，上下颠倒混匀 10 次，然后冰浴静置 10min；**# 注意**：在加入 ETR Solution 后，裂解液可能出现浑浊，但冰浴后将逐渐变澄清。
4. 按照第 3-4 页的步骤 7-18 进行操作。

★ 产品信息卡

D6948 D6950 UM

更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读

D6948-TS

常见问题合集及操作注意事项

请扫描左方二维码获取

omega BIO-TEK

中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200（人工客服在线）

中文网站：***omegabiotek***. com.cn

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取