转化级快速过滤质粒中量提取试剂盒

E.Z.N.A.® FastFilter Plasmid DNA Midi Kit

货号	D6905-00	D6905-01	D6905-03	D6905-04
反应次数	2 次	5 次	25 次	100 次
HiBind® DNA Midi Columns	2 个	5 个	25 个	100 个
15 mL Collection Tubes	2 个	5 个	25 个	100 个
Lysate Clearance Filter Syringe	2 个	5 个	25 个	100 个
Solution I	6 mL	30 mL	80 mL	270 mL
Solution II	6 mL	30 mL	80 mL	270 mL
N3 Buffer	4 mL	20 mL	40 mL	140 mL
GBT Buffer	6 mL	30 mL	60 mL	230 mL
HBC Buffer	5 mL	12 mL	60 mL	160 mL
DNA Wash Buffer	5 mL	15 mL	40 mL	4 x 40 mL
RNase A	20 μL	100 μL	300 μL	1.2 mL
Elution Buffer	5 mL	20 mL	60 mL	250 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. RNase A 加入到 Solution I 后请置于 2-8℃保存；
4. 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；
5. 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；
6. 本试剂盒仅供科学研究使用。

★ 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
D6905-00	20 mL	2 mL
D6905-01	60 mL	4.7 mL
D6905-03	160 mL	24 mL
D6905-04	160 mL（每瓶）	63 mL

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 无水乙醇、异丙醇
- ✓ 离心速度可达 4,000xg 的吊篮式离心机
- ✓ 离心速度可达 15,000xg 的离心机
- ✓ 涡旋仪、冰浴盒
- ✓ 无菌无酶能够承受 15,000xg 离心力的 15、50mL 离心管
- ✓ （可选）真空抽滤装置、温度可达 65℃的孵育装置
- ✓ （可选）3M NaOH、无菌水

★ 提取步骤 —— 离心方案

1. 取 20-50mL 的菌液，室温下 4,000xg 离心 10min，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，HiBind® DNA Midi Column 可承载的最大细菌量为 80-100（OD600 x mL 培养菌液）。例如：培养菌液的 OD600 为 4.0，则最佳菌液取用量为 20-25mL。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 2.25 mL 的 Solution I/RNase A 混合液，漩涡振荡或吸打混匀使细菌完全重新悬浮；

   # 注意：Solution I 使用前必须加入 RNase A。

3. 转移悬浮菌液到可以承受 15,000xg 离心力的离心管中，加入 2.25 mL 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。静置时间过长可能会导致质粒 DNA 断裂（当使用完 Solution II 以后，须盖紧瓶盖保存）。

4. 加入 1.25 mL 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。可在室温下静置孵育 2-3min；
5. 加入 2 mL GBT Buffer，轻柔颠倒 4 次；

   # 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，直至溶液完全中和，溶液的完全中和对获得高产量至关重要。

6. 准备一个过滤针筒，拉出针筒中的活塞，将针筒竖直放在一个合适的离心管架上，把蓝色尾盖盖在针筒出口处；
7. 在针筒下端出口处放置一个 15mL 离心管，针筒开口朝上。将裂解液倒入过滤器的针筒中，移除尾盖。小心地将针筒活塞插入针筒中，慢慢推动活塞使裂解液流入下方离心管中；

   # 可选：可用 4℃,15000xg 离心 10 分钟去除沉淀杂质替代用过滤针筒过滤沉淀杂质。

   # 注意：最后可能会有小部分的裂解液停留在絮状沉淀中，不要强行将残余裂解液推出过滤器，否则会有小部分的沉淀流到下方离心管中。如果有沉淀流到过滤液中，可离心去除沉淀。

   # 注意：以下步骤建议使用吊篮式离心机以获得最大质粒产量，全部离心均在室温条件下进行。

8. 把 HiBind® DNA Midi Column 套入 15mL 收集管中；

   # 可选柱平衡处理：

   1）往空 HiBind® DNA Midi Column 内加入 1mL GPS Buffer；

   2）室温静置 4min，室温下 4,000xg 离心 3min，弃除滤液。

9. 转移不超过 3.5mL 混合液至 HiBind® DNA Midi Column，室温下 4,000xg 离心 3min，弃滤液；
10. 重复步骤 9，直至步骤 7 所得混合液全部结合到结合柱中；

11. 把 HiBind® DNA Midi Column 套入同一个收集管中，加入 3 mL HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释）到 HiBind® DNA Midi Column 中，室温下 4,000xg 离心 3min，弃滤液；

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

12. 把 HiBind® DNA Midi Column 套入同一个收集管中，加入 3.5 mL DNA Wash Buffer (已加无水乙醇正确稀释)，室温下 4,000xg 离心 3min，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。

13. 重复步骤 12 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤；
14. 把 HiBind® DNA Midi Column 套入同一个收集管中，室温下 4,000xg 离心空甩 10min 以干燥结合柱基质；
15. 把 HiBind® DNA Midi Column 套入一干净的 15 mL 离心管中，加入 0.5-1 mL Elution Buffer 到结合柱基质上，室温下静置 3min；
16. 4,000xg 离心 5 min 以洗脱出 DNA；

    # 注意：首次洗脱可获得 65-80%的质粒 DNA，可按照实际需求进行二次洗脱。

    - 用新的 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 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）

17. 弃除结合柱，把 DNA 产物保存于-20℃。

★ 提取步骤——真空抽滤方案

这个方案采用真空抽滤方案来提取质粒，使用真空抽滤可大大减少离心时间，减少重复倒弃滤液和加液的过程。使用前请详细阅读离心方案，并离心方案的步骤 1-7 进行细菌的收集，重悬，裂解，中和以及离心去除杂质，以获得澄清的上清液。

1. 按照离心方案的 1-7 步，准备好澄清的细菌裂解液；
2. 按使用说明准备好真空抽滤器，把 HiBind® DNA Midi Column 连接到抽滤器；
3. 转移细菌裂解液到 HiBind® DNA Midi Column，小心不要超过结合柱的容积（3.5mL），用真空抽滤让裂解液通过结合柱，转移剩下的裂解液到结合柱，抽滤，直到所有的裂解液都通过结合柱；

4. 加 3mL HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释）到 HiBind® DNA Midi Column，抽滤让液体流过结合柱；
5. 洗涤结合柱：加 3.5mL DNA Wash Buffer（已加无水乙醇正确稀释），抽滤；
6. 重复步骤 5，再加 3.5mL DNA Wash Buffer 洗涤 HiBind® DNA Midi Column；
7. 把 HiBind® DNA Midi Column 套入同一个收集管中，室温下 4,000xg 离心空甩 10min 以干燥结合柱基质；
8. 把 HiBind® DNA Midi Column 套入一干净的 15 mL 离心管中，加入 0.5-1 mL Elution Buffer 到结合柱基质上，室温下静置 3min；
9. 4,000xg 离心 5 min 以洗脱出 DNA；

   # 注意：首次洗脱可获得 65-80%的质粒 DNA，可按照实际需求进行二次洗脱。

   - 用新的 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 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）
10. 弃除结合柱，把 DNA 产物保存于-20℃。

★ 质粒 DNA 浓缩步骤

1. 小心转移已洗脱的质粒到一干净的适合做沉淀的离心管；
2. 加入 1/10 倍产物体积的 3M NaAC（pH5.2）和 0.7 倍产物体积异丙醇（室温），涡旋混匀；
3. 4℃，>15,000xg 离心 20min，小心弃除上清保留沉淀；
4. 用 1-2mL 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀；
5. 4℃，>15,000xg 离心 10 min 收集沉淀。小心弃除上清，不要吸到沉淀物；
6. 空气干燥质粒沉淀 10 min；
7. 用 50-500μL（体积可自行控制，加入量能完全溶解沉淀即可）Elution Buffer 或 Buffer TE 溶解质粒。

★ 低拷贝数质粒方案

1. 低拷贝数的质粒通常情况下从每毫升过夜培养的菌液中可得到 0.1-1μg DNA。对于从低拷贝数质粒（0.1-1μg/mL 培养基）或低-中量拷贝数质粒（1-2μg/mL 培养基）细菌中分离质粒，如有需要，可以通过此改良方法来提高产量；
2. 用 50-100mL 菌液，3,500-5,000xg 离心 10min。按照离心操作方案操作，加入两倍体积的 Solution I、Solution II、N3 Buffer 及 GBT Buffer。只用一个 HiBind® DNA Midi Column 继续按照前面的操作进行；
3. 无须加大 HBC Buffer 和 DNA Wash Buffer 的用量，Solution I、Solution II 及 N3 Buffer 均可单独购买。

 # 注意：这方法不适用于高拷贝数质粒，因为超过 50mL 培养基，中量结合柱很快就会饱和。这种情况下，我们推荐把同一培养基里的样品分成多个样品处理。

★ 提取步骤示意图

离心操作流程



离心收集菌体沉淀

重悬、裂解、中和

裂解液转移至过滤器内

过滤获得上清

转移混合液至结合柱内

洗涤

干燥

洗脱质粒

真空抽滤操作流程



离心收集菌体沉淀

重悬、裂解、中和

裂解液转移至过滤器内

过滤获得上清

把结合柱插到真空抽滤盒

转移混合液至结合柱内

洗涤

干燥

洗脱质粒

★ 产品信息卡

D6905 D6924 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

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

售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源，请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒，我司恕不提供任何质量保证及售后服务。