

转化级质粒中量提取试剂盒 中文操作说明

E.Z.N.A.[®] Plasmid DNA Midi Kit

货号	D6904-00	D6904-01	D6904-03	D6904-04
反应次数	2 次	10 次	25 次	100 次
HiBind [®] DNA Midi Columns	2 个	10 个	25 个	100 个
15 mL Collection Tubes	2 个	10 个	25 个	100 个
Solution I	8 mL	30 mL	70 mL	270 mL
Solution II	8 mL	30 mL	70 mL	270 mL
Solution III	8 mL	40 mL	100 mL	2 x 200 mL
HBC Buffer	5 mL	25 mL	58 mL	2 x 115 mL
DNA Wash Buffer	5 mL	15 mL	40 mL	3 x 50 mL
RNase A	25 μ L	100 μ L	300 μ L	1.2 mL
Elution Buffer	5 mL	25 mL	60 mL	220 mL
User Manual	✓	✓	✓	✓

★ 保存方式及稳定性

- 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；
- 收到试剂盒后，请把 RNase A 置于 -20°C 作长期保存；
- RNase A 加入到 Solution I 后请置于 2-8°C 保存；
- 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；
- 当贮存温度较低时，HBC Buffer、Solution II 及 Solution III 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
- 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°C 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	HBC Buffer 稀释
	无水乙醇 加入量	异丙醇 加入量
D6904-00	20 mL	2 mL
D6904-01	60 mL	10 mL
D6904-03	160 mL	23 mL
D6904-04	200 mL (每瓶)	46 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 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°C 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，结合膜有可能发生超载情况。
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 3.2 mL 预冷的 Solution III, 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;
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。
5. 室温下 (4°C更佳) 15,000xg 离心 10min 去除沉淀杂质;
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。
6. 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。
7. 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;
8. 重复步骤 7, 直至步骤 5 所得混合液全部结合到结合柱中;
9. 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正确用异丙醇稀释。
10. 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;
11. 重复步骤 10 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤;
12. 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;
13. 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；

14. 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)

15. 弃除结合柱, 把 DNA 产物保存于-20°C。

★ 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。使用前请仔细阅读离心方案, 并离心方案的步骤 1-5 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 1-5 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 (4mL), 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°C。

★ 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°C, >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°C, >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 50-500 μ L (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 0.1-1 μ g DNA。对于从低拷贝数质粒 (0.1-1 μ g/mL 培养基) 或低-中量拷贝数质粒 (1-2 μ g/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 及 Solution III。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 Solution III 均可单独购买。

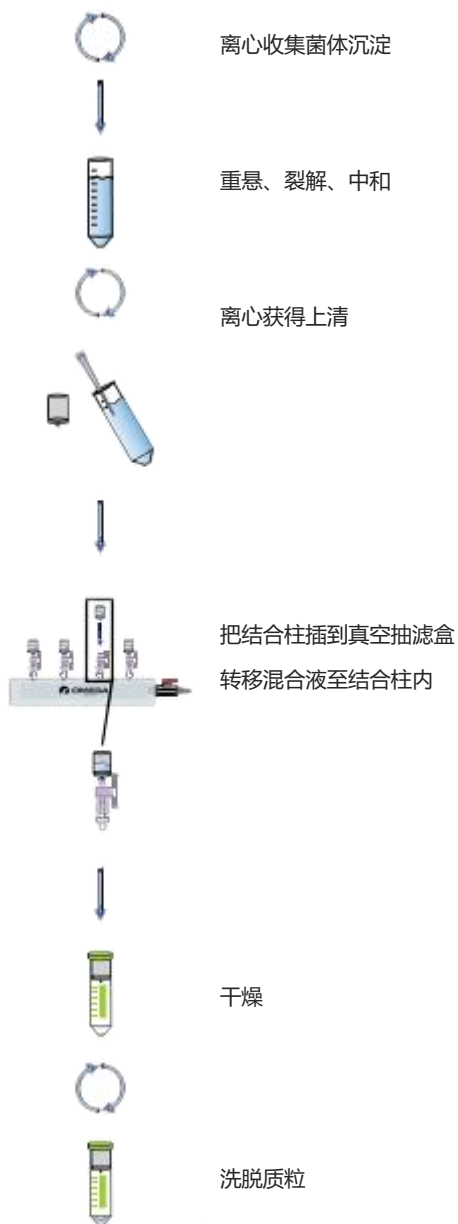
注意：这方法不适用于高拷贝数质粒，因为超过 50mL 培养基，中量结合柱很快就会饱和。这种情况下，我们推荐把同一培养基里的样品分成多个样品处理。

★ 提取步骤示意图

离心操作流程



真空抽滤操作流程



★ 产品信息卡



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



常见问题合集及操作注意事项

请扫描左方二维码获取



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。

