

无内毒素质粒小量 II 型提取试剂盒

E.Z.N.A.[®] Endo-Free Plasmid DNA Mini Kit II

货号	D6950-00B	D6950-01B	D6950-02B
反应次数	5 次	50 次	200 次
HiBind [®] DNA Mini Columns II	5 个	50 个	200 个
2 mL Collection Tubes	5 个	50 个	200 个
Solution I	5 mL	30 mL	120 mL
Solution II	5 mL	30 mL	120 mL
N3 Buffer	2.5 mL	15 mL	60 mL
ETR Binding Buffer	10 mL	80 mL	2 x 160 mL
ETR Wash Buffer	5 mL	30 mL	120 mL
HBC Buffer	4 mL	25 mL	80 mL
DNA Wash Buffer	2 mL	15 mL	3 x 25 mL
RNase A	Pre-added	100 μ l	400 μ l
Endo-free Elution Buffer	5 mL	15 mL	40 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℃作长期保存；
- 把 RNase A 对应加入到 Solution I 后请置于 2-8℃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，ETR Binding Buffer、ETR Wash Buffer、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；
- 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°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
D6950-00B	8 mL	1.6 mL
D6950-01B	60 mL	10 mL
D6950-02B	100 mL (每瓶)	32 mL

★ 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
- ✓ 离心速度可达 5,000xg 的吊篮式离心机
- ✓ 涡旋仪、冰浴盒、培养管
- ✓ 温度可达 70°C 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 10-15 mL LB 培养基培养过夜的菌液，室温下 5,000xg 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，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 500 μ l 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 500 μ l 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 250 μ l 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 2 mL 离心管，估算上清液体积，加入 1 倍上清液体积的 ETR Binding Buffer 至裂解清液中，上下颠倒混匀 10 次；
7. 把 HiBind[®] DNA Mini Columns II 套入 2 mL 收集管中；

可选柱平衡处理：

- 1) 往空的 HiBind[®] DNA Mini Columns II 内加入 100 μ l 3M NaOH；
- 2) 12,000xg 离心 1min，弃除滤液。
8. 转移不超过 700 μ l 混合液至 HiBind[®] DNA Mini Columns II，室温下 12,000xg 离心 1min，弃滤液；
9. 重复步骤 8，直至步骤 6 所得混合液全部结合到 HiBind[®] DNA Mini Columns II 中；
10. 把 HiBind[®] DNA Mini Columns II 套入同一个收集管中，加入 500 μ l ETR Wash Buffer 到 HiBind[®] DNA Mini Columns II 中，室温下 12,000xg 离心 1min，弃滤液；
11. 把 HiBind[®] DNA Mini Columns II 套入同一个收集管中，加入 500 μ l HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释）到 HiBind[®] DNA Mini Columns II 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。

12. 把 HiBind[®] DNA Mini Columns II 套入同一个收集管中，加入 700 μ l 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。

13. 重复步骤 12 进行第二次 DNA Wash Buffer 洗涤；
14. 把 HiBind[®] DNA Mini Columns II 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；

15. 把 HiBind® DNA Mini Columns II 套入一干净的 1.5 mL 收集管中，加入 60-100µl Endo-Free Elution Buffer 到结合柱基质上，室温下静置 1 min；
16. 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）
17. 弃除结合柱，把 DNA 产物保存于-20°C。

★ 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 300µL 的 ETR Binding Buffer 至质粒产物中，上下颠倒混匀 10 次；
3. 按照第 3-4 页的步骤 7-17 进行操作。

★ 产品信息卡



D6948B D6950B-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



D6950B-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