

## 无内毒素质粒大量提取试剂盒 中文操作说明

### E.Z.N.A.<sup>®</sup> Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit

| 货号                                   | D6926-00 | D6926-01 | D6926-03  | D6926-04   |
|--------------------------------------|----------|----------|-----------|------------|
| 反应次数                                 | 2 次      | 6 次      | 25 次      | 100 次      |
| HiBind <sup>®</sup> DNA Maxi Columns | 2 个      | 6 个      | 25 个      | 100 个      |
| 50 mL Collection Tubes               | 2 个      | 6 个      | 25 个      | 100 个      |
| Lysate Clearance Filter Syringe      | 2 个      | 6 个      | 25 个      | 100 个      |
| Solution I                           | 25 mL    | 70 mL    | 270 mL    | 5 x 220 mL |
| Solution II                          | 25 mL    | 70 mL    | 270 mL    | 5 x 220 mL |
| N3 Buffer                            | 12 mL    | 35 mL    | 135 mL    | 2 x 270 mL |
| ETR Solution                         | 10 mL    | 20 mL    | 70 mL     | 270 mL     |
| GPS Buffer                           | 15 mL    | 40 mL    | 150 mL    | 2 x 270 mL |
| HBC Buffer                           | 16 mL    | 50 mL    | 190 mL    | 5 x 160 mL |
| DNA Wash Buffer                      | 12 mL    | 35 mL    | 3 x 45 mL | 10 x 54 mL |
| RNase A                              | 120 µl   | 350 µl   | 1.4 mL    | 5 x 1.1 mL |
| Endo-free Elution Buffer             | 15 mL    | 45 mL    | 175 mL    | 3 x 230 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. 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；

- 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°C 中, 至沉淀完全溶解, 充分混匀后再使用。

## ★ 实验前准备

- 将一管 RNase A 加入到一瓶 Solution I 瓶内, 混匀后 2-8°C 保存;
- 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       |
| D6926-00 | 48 mL              | 6.4 mL        |
| D6926-01 | 140 mL             | 20 mL         |
| D6926-03 | 180 mL (每瓶)        | 76 mL         |
| D6926-04 | 216 mL (每瓶)        | 64 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
- ✓ 涡旋仪、冰浴盒
- ✓ 温度可达 42°C、70°C 的孵育装置
- ✓ 无菌无酶的 50mL 离心管、符合所需收菌体积的离心瓶
- ✓ (可选) 真空抽滤装置

## ★ 提取步骤 —— 离心方案

- 取 50-200 mL 的菌液, 室温下 4,000xg 离心 10 分钟, 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 Maxi Column 可承载的最大细菌量为 300-400(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 75-100mL。若使用过量的菌液, 结合膜有可能发生过载情况。
- 弃培养液, 往沉淀中加入 10 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. 加入 10 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 2-3 分钟；

**# 注意：**避免剧烈混合裂解液，静置时间不应超过 5 分钟，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 5 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 分钟；

**# 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. 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；

6. 在针筒下端出口处放置一个 50mL 离心管，针筒开口朝上。立即将裂解液倒入过滤器的针筒中，移除尾盖。小心地将活塞插入针筒中，慢慢推动活塞使裂解液流入下方离心管中；

**# 可选：**可用 4°C, 15,000xg 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，可通过离心去除沉淀。

7. 估算获得的过滤裂解清液体积，加入 0.1 倍过滤清液体积的 ETR Solution 至裂解清液中，上下颠倒混匀 10 次，然后冰浴静置 10 分钟；

**# 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。

8. 将上述裂解液于 42°C 水浴 5 分钟。裂解液又将再次出现浑浊。此时于 25°C 下，4,000xg 离心 5 分钟，ETR Solution 将在离心管底部形成蓝色分层；
9. 将上清液移至另一新的 50mL 离心管中，加入 0.5 倍上清体积无水乙醇，轻轻上下颠倒离心管 6-7 次，室温放置 1-2 分钟；

10. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入 50 mL 收集管中；
- # 可选柱平衡处理：**
- 1) 往空 HiBind® DNA Maxi Column 内加入 3mL GPS Buffer；
  - 2) 室温静置 4 分钟，室温下 4,000xg 离心 3 分钟，弃滤液。
11. 转移不超过 20 mL 混合液至 HiBind®DNA Maxi Column，室温下 4,000xg 离心 3 分钟，弃滤液；
12. 重复步骤 11，直至步骤 9 所得混合液全部结合到结合柱中；
13. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入同一个收集管中，加入 10 mL HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释）到 HiBind® DNA Maxi Column 中，室温下 4,000xg 离心 3 分钟，弃滤液；
- # 注意：**HBC Buffer 使用前必须按说明书用异丙醇正确稀释。
14. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入同一个收集管中，加入 15 mL DNA Wash Buffer（已加无水乙醇正确稀释），室温下 4,000xg 离心 3 分钟，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。
15. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入同一个收集管中，加入 10 mL DNA Wash Buffer（已加无水乙醇稀释），室温下 4,000xg 离心 3 分钟，弃滤液；
16. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入同一个收集管中，室温下 4,000xg 离心空甩 10 分钟以干燥结合柱基质；
17. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入一干净的 50 mL 收集管中，加入 1-3mL Endo-Free Elution Buffer 到结合柱基质上，室温下静置 3 分钟；
18. 4,000xg 离心 5 分钟以洗脱出 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 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 重新加至结合柱内进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）。
19. 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 1-9 进行细菌的收集，重悬，裂解，中和，过滤去除杂质以及使用 ETR Solution 去除内毒素，以获得澄清的上清液。

1. 按照离心方案的 1-9 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 Maxi Column 连接到抽滤器；
3. 转移细菌裂解液到 HiBind® DNA Maxi Column，小心不要超过结合柱的容积（20mL），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. 加入 10 mL HBC Buffer（已加异丙醇正确稀释）到 HiBind® DNA Maxi Column，抽滤让液体流过结合柱；
5. 加入 15 mL DNA Wash Buffer（已加无水乙醇正确稀释），抽滤让液体流过结合柱；
6. 加入 10 mL DNA Wash Buffer（已加无水乙醇正确稀释），抽滤让液体流过结合柱；
7. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入同一个收集管中，室温下 4,000xg 离心空甩 10 分钟以干燥结合柱基质；
8. 把 HiBind® DNA Maxi Column 套入一干净的 50 mL 收集管中，加入 1-3 mL Endo-Free Elution Buffer 到结合柱基质上，室温下静置 3 分钟；
9. 4,000xg 离心 5 分钟以洗脱出 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 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 重新加至结合柱内进行二次洗脱（可增加洗脱浓度但不增加洗脱体积）。

10. 弃除柱子，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 20 分钟，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 分钟收集沉淀。小心弃除上清，不要吸到沉淀物；
6. 空气干燥质粒沉淀 10 分钟；
7. 用 50-500μl (体积可自行控制，加入量能完全溶解沉淀即可) Endo-Free Elution Buffer 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 200-400mL 菌液，3,500-5,000xg 离心 10 分钟。按照离心操作方案操作，加入两倍体积的 Solution I、Solution II 及 N3 Buffer。只用一个 HiBind® DNA Maxi Column 继续按照前面“离心方案”或“真空抽滤方案”进行提取。
3. 无须加大 HBC Buffer 和 DNA Wash Buffer 的用量。Solution I、Solution II、N3 Buffer 及 ETR Solution 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 200mL 培养基，HiBind® DNA Maxi Column 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

转移上清至过滤针筒

轻推推筒让澄清的上清液流  
至 50mL 收集管

加入 ETR Solution

## 冰浴

42°C 孵育

离心分层转移上清

加入 0.5 体积无水乙醇

转移混合液至结合柱内

洗滌、干燥

### 洗脱出无内毒素质粒

## 真空抽滤操作流程

### 离心收集菌体沉淀

## 重悬、裂解

转移上清至过滤针筒

轻推推筒让澄清的上清液流  
至 50mL 收集管

## 加入 ETR Solution

## 冰浴

42°C 孵育

离心分层转移上清

加入 0.5 体积无水乙醇

把结合柱插到抽滤盒上

转移混合液至结合柱内

洗涤、干燥

### 洗脱出无内毒素质粒

## ★ 产品信息卡



原文版本号: January 2019 v4.0

**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。