



UltraPure Plasmid Midiprep Kit (Anion Exchange Chromatography)

离子交换质粒中提试剂盒 (BW-PD5002)

本试剂盒使用离子交换技术，可以从 100-200 mL 菌液中纯化 ≥ 500 ug 的无内毒素（内毒素水平 ≤ 0.1 EU/ug 质粒）质粒 DNA。提取产物适用于敏感细胞系（原代细胞）的转染、体内实验（基因治疗、显微注射和疫苗研究）及其他常规应用等。

试剂盒组成

Catalog#	BW-PD5002-00	BW-PD5002-01	BW-PD5002-02
Preps	2	10	25
AEC Column A	2	10	25
2 mL Microfuge Tube	4	20	50
Buffer A1	25 mL	110 mL	260 mL
Buffer B1	25 mL	110 mL	260 mL
Buffer N3	25 mL	110 mL	260 mL
Buffer BEQ	25 mL	110 mL	260 mL
Buffer BWH	25 mL	110 mL	260 mL
Buffer BEL	35 mL	160 mL	400 mL
Endofree Elution Buffer	15 mL	15 mL	30 mL
RNase A	125 μ L	550 μ L	1300 μ L
User Manual	1	1	1

储存条件

本试剂盒 4-28°C 保存；有效期自生产之日起 12 个月。

注意事项

- RNase A: 使用前瞬时离心后全部加入 Buffer A1 中混匀使用，并于 4°C 保存。
- Buffer B1: 低温保存时可能会形成沉淀。此时请于 37°C 水浴加热至沉淀完全溶解、溶液澄清后使用。使用后确保 Buffer B1 瓶盖拧紧。
- Buffer N3: 低于 10°C 可能形成沉淀，使用前请于 37°C 水浴加热溶解。
- 【自备】70%乙醇、异丙醇。
- 【自备】无热源的 50 mL 离心管、移液器吸头等耗材。





推荐试剂用量

试剂名称	菌液体积	
	100 mL	200 mL
Buffer A1 + RNase A	8 mL	10 mL
Buffer B1	8 mL	10 mL
Buffer N3	8 mL	10 mL
Buffer BEQ	8 mL	8 mL
Buffer BWH	10 mL	10 mL
Buffer BEL	15 mL	15 mL
Endofree Elution Buffer	1 mL	1 mL

操作步骤

以下步骤中含斜杠的数据，如“**8 mL / 10 mL**”，斜杠前面为**100 mL**菌液推荐用量，斜杠后面为**200 mL**菌液推荐用量；没有斜杠的数据为通用的试剂用量。

1. 在**AEC Column A**中加入**8 mL Buffer BEQ**，使用重力流方式（下同）平衡离子交换柱，弃过柱液。平衡好的**AEC Column A**供**步骤7**使用。注：离子交换柱的平衡过程一般需要30分钟左右，建议提前进行此步操作。
2. 通过多次离心（**室温，6,000 ×g，15min**）在50 mL离心管中收集**100 mL / 200 mL**过夜培养的菌液；弃上清，将离心管倒扣在纸巾上除去残留的液体培养基。注：过度培养或培养基残留都可能会导致质粒得率下降。
3. 加入**8 mL / 10 mL Buffer A1**（确保已加入RNase A），使用移液器吹打或涡旋震荡，使细菌充分悬浮，无菌块。注：充分悬浮细菌对后续菌体裂解及裂解液的中和十分重要。
4. 加入**8 mL / 10 mL Buffer B1**（确保无沉淀析出或已通过加热方式溶解沉淀），温和反转**5-10次**，然后静置**5 min**至溶液粘稠而澄清。注：静置时间不超过5 min，时间过长会导致基因组DNA污染或质粒受损。
5. 加入**8 mL / 10 mL Buffer N3**，温和反转**5-10次**，至溶液充分混匀，此时出现白色絮状沉淀，**静置5min**。注：此步须充分混合，如果混合物仍然呈现圆球状、褐色或者比较粘稠，则需继续混合以完全中和裂解液。
6. **室温，≥12,000 ×g**离心**10 min**。注：若上清中仍有白色沉淀，可将上清转移到新的离心管中，**≥12,000 ×g**再次离心5 min。





7. 小心将上清（避免吸起沉淀）转移至**预先平衡好的AEC Column A**中，弃过柱液体。
8. 在**AEC Column A**中加入**10 ml Buffer BWH**，弃过柱液体。
9. 在**AEC Column A**中加入**15 ml Buffer BEL**，使用新的无热源的50 mL离心管（自备）**收集**过柱液体。

后续纯化过程可以选择常规**离心沉淀法**或**过柱法**。离心沉淀法操作简单，但相对耗时，且需要有低温高速离心机的支持。过柱法相对省时，无需低温离心机，但操作环节稍多，且需要单独购买Express Column A（Cat: BW-BD10031，附送Plastic Wrench）。

可选方案1：离心沉淀法

10. 向**步骤9**的过柱收集液中加入**0.7倍体积**的**异丙醇**（比如15 mL过柱液体，加入10.5 mL异丙醇），颠倒混匀后**4℃，14,000 ×g**离心**30min**；离心结束后小心吸弃上清。
11. 在离心管中加入**3 mL 70%乙醇**，轻轻摇晃几下；**室温，14,000 ×g**离心**10min**；离心结束后小心吸弃上清。
12. 离心管敞口在空气中晾干**5-10 min**，加**1 ml Endofree Elution Buffer**，枪头轻轻吹打使其完全溶解。注：不可使其过于干燥，否则将难以溶解。
13. 将质粒溶液转移到**2 mL Microfuge Tube**中保存备用。

可选方案2：过柱法

过柱方案需提前向倍沃医学单独购买**Express Column A**（Cat: BW-BD10031，附送**Plastic Wrench**）。

10. 向**步骤9**的过柱收集液中加入**0.7倍体积**的**异丙醇**（比如15 mL过柱液体，加入10.5 mL异丙醇），颠倒混匀后室温**静置2 min**。
11. 将混合液加入**Express Column A**，利用柱塞挤压过滤，弃滤液。
12. 用**Plastic wrench**将膜柱从**Express Column A**拆下，拔出柱塞；重新组装**Express Column A**，加入**2 mL 70%乙醇**，插入柱塞，挤压过滤，弃滤液。
13. 用**Plastic wrench**将膜柱从**Express Column A**拆下，将其放入**2 mL Microfuge Tube**中，**≥12,000 ×g**离心**1 min**，弃滤液。
14. 再次将膜柱放回**2 mL Microfuge Tube**，**≥12,000 ×g**离心**2 min**。
15. 将膜柱放入新的**2 mL Microfuge Tube**离心管中，空气中晾干**5-10 min**。





16. 在膜柱中加入**500 μ L Endofree Elution Buffer**，静置1min， $\geq 12,000 \times g$ 离心**1 min**；再向膜柱中加入**300 μ L Endofree Elution Buffer**，静置1min， $\geq 12,000 \times g$ 离心**1 min**。获得的质粒可以直接用于下游应用或保存备用。注：可将洗脱下来的液体吸取400 μ L重新上柱、离心，这样可提升质粒收获量。

常见问题

问题	可能原因	建议
质粒得率低	裂解不完全	加入 Buffer B1 后充分混匀。
		若瓶盖未拧紧，重配 Buffer B1（0.2 M NaOH，1% SDS）。
	菌液过度培养或不新鲜	菌液培养 12-16 h 为佳，若当天来不及纯化，将菌液离心后收集菌体-20℃保存。请勿将菌液置于 4℃过夜。
	质粒拷贝数低	增加培养基和 Buffer A1、B1、N3 用量。
没有质粒	质粒在宿主菌内丢失	重新准备新鲜菌液。
基因组污染	加入 Buffer B1 后时间超过 5 min，或者震荡过于剧烈。	加入 Buffer B1 后不要剧烈震荡，孵育时间不要超过 5 min。

购买须知

根据说明书使用时，本产品保证性能符合产品标示和倍沃文献中的描述。倍沃不提供任何其他类型的明示或暗示保证，包括但不限于适销性或特定用途适用性等。倍沃对违反本保证的唯一义务和购买者的唯一补救措施是由倍沃选择更换产品。倍沃对因使用产品、使用产品结果或无法使用产品而引起的任何直接、间接、后果性或附带损害不承担任何责任。如需技术支持或了解更多信息，请致电 400-115-2855 与我们联系，或访问我们的网站 www.biomiga.com.cn。

