

10 分钟快速去内毒素质粒小提试剂盒简明说明书 (BW-PD1219)

产品简介

本试剂盒的关键在于使用专利 Lysate Clearance Column, 使得 1-2 mL 大肠杆菌菌液在 30 秒内过滤裂解液。整个提取过程仅需要 10 分钟。而且缓冲液系统中不含离液盐, 它是目前市场上唯一一种基于玻纤的环保型质粒小提试剂盒。

该试剂盒使用一种独特的缓冲液, 可从质粒 DNA 中去除内毒素。纯化得到的质粒可用于下游应用例如内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Mini Columns (White ring)	10	50	250
Lysate Clearance Columns (Green ring)	10	50	250
2 mL Collection Tubes	10	50	250
Buffer F1	2.4 mL	12 mL	60 mL
Buffer F2	2.4 mL	12 mL	60 mL
Buffer F3	2.4 mL	12 mL	60 mL
Buffer RET	2.4 mL	12 mL	60 mL
Buffer KB	6 mL	30 mL	150 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	7 mL	35 mL
Endofree Elution Buffer	1 mL	7 mL	35 mL
RNase A (20 mg/mL)	12 µL	60 µL	300 µL
User Manual	1	1	1

要点

- Buffer F1: 使用前将提供的所有 RNase A 瞬时离心后加入 Buffer F1, Buffer F1/RNase A 储存于 4°C。
- Buffer F2: 若形成沉淀, 使用前请于 37°C 水浴加热至沉淀完全溶解。
- DNA Wash Buffer: 使用前请将 12 mL (BW-PD1219-00) 或 28 mL (BW-PD1219-01) 或 140 mL (BW-PD1219-02) 96-100% 乙醇加入至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。加入 RNase A 后的 Buffer F1 后应储存于 4°C。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 小型台式离心机或真空负压装置
- 1.5 mL 离心管

操作步骤

1. 12,000 rpm 离心 1 min 收集新鲜的 **1-2 mL** 菌液, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。
2. 加入 **200 µL Buffer F1** (使用前加入 **RNase A**), 用移液器或涡旋震荡仪充分悬浮细菌细胞。
3. 加入 **200 µL Buffer F2**, 轻轻地反转 10 次以混匀 (不要涡旋),

注: 充分重悬对于细菌裂解和裂解液中和是至关重要的。

室温静置 1-2 min 直至溶液变得澄清。

4. 加入 **200 µL Buffer F3**, 立即反转 5 次以混匀, 室温孵育 2 min。
5. 转移全部裂解液至 **Lysate Clearance Column (Green ring)**, 10,000 rpm 离心 30 s。

注: 若裂解液仍旧在柱子内, 再离心 30 s。

6. 丢弃 **Lysate Clearance Column**, 加入 **200 µL Buffer RET** 和 200 µL 100% 乙醇至含有滤液的 **2 mL Collection Tube**, 用枪头吹打混匀。

7. 小心转移 **750 µL** 澄清的裂解液至 **Mini Column (White ring)** (自带 **2 mL Collection Tube**), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。重复步骤 7 直至所有裂解液通过。

8. **可选:** 加入 **500 µL Buffer KB**, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

注: 此步骤对于 endA-菌株例如 DH5α 和 TOP10 而言不是必要的, Buffer KB 对于 endA+菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的。

9. 加入 **600 µL DNA Wash Buffer** (使用前确保加入乙醇), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃滤液。

可选: 重复步骤 9。

10. 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**, 12,000 rpm 离心 1 min。

注: 开盖离心可更加有效地去除残留乙醇。

11. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管, 在膜中央加入 **50-100 µL Endofree Elution Buffer**, 静置 1 min, 12,000 rpm 离心 30 s 洗脱质粒 DNA。

可选：将洗脱下来的液体重新上柱，二次洗脱。

注：第一次洗脱可得到大约 70%的质粒 DNA，将洗脱下来的溶液二次上柱会回收另外 20-30%的 DNA。

12. DNA 浓度的确定，

浓度 (μg/mL) = OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数

常见问题解答

问题	可能原因	建议
低得率	裂解不完全	加入 Buffer F2 后充分混匀。 如果瓶盖没拧紧,重配 Buffer F2 (0.2 M NaOH 和 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保存于-20°C。请勿将菌液置于 4°C过夜。
没有 DNA	质粒在宿主菌内丢失	准备新鲜的菌液。
基因组污染	加入 Buffer F2 后超过 5 min	加入 Buffer F2 后不要剧烈震荡,孵育时间不要超过 5 min。
RNA 污染	RNase A 没有加入至 Buffer F1	在 Buffer F1 中加入 RNase A。
质粒跑出点样孔	乙醇没去干净	洗脱前确保没有乙醇残留。如果必要的话,可再次离心。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA (中国)

www.biomiga.com.cn

400-115-2855

info@biomiga.com.cn