

质粒小提试剂盒 II 简明说明书 (BW-PD1213)

Ver: 1904

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, Mini Column 高效吸附 DNA, 同时蛋白质和其他杂质通过漂洗液去除。核酸最终通过无菌水或者 Elution Buffer 洗脱。

本试剂盒适用于从 5-12 mL 大肠杆菌培养液中提取质粒, 提供的 Mini Column 可结合至多 120 µg 质粒 DNA。1 mL 菌液可获得 8-12 µg 质粒。

纯化得到的质粒可用于下游应用, 例如克隆/亚克隆, RFLP, 测序, HEK293 细胞的转染。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02	-03
Preps	10	50	100	250
Mini Columns	10	50	100	250
2 mL Collection Tubes	10	50	100	250
Buffer A1	5 mL	25 mL	47 mL	120 mL
Buffer B1	5 mL	25 mL	47 mL	120 mL
Buffer N1	6 mL	30 mL	57 mL	150 mL
Buffer KB	6 mL	28 mL	52 mL	135 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	15 mL	2 x 15 mL	3 x 24 mL
Elution Buffer	1.8 mL	8 mL	17 mL	40 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 µL	125 µL	235 µL	600 µL
User Manual	1	1	1	1

要点

- RNase A: 20 mg/mL, 室温下 (15-25°C) 可稳定贮藏一年。使用前将提供的所有 RNase A 瞬时离心后加入 Buffer A1, 使用后将 Buffer A1/RNase A 置于 4°C 保存。
- DNA Wash Buffer: 使用前请将 12 mL (BW-PD1213-00) 或 60 mL (BW-PD1213-00) 或 60 mL (BW-PD1213-02) 或 96 mL (BW-PD1213-03) 96-100%乙醇加入至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。
- Buffer B1: 低于室温时会沉淀, 请于 37°C 水浴加热至沉淀完全溶解, 溶液澄清。使用后保证 Buffer B1 瓶盖拧紧。
- 确保离心机转速可以达到 12,000 rpm, 在室温下 (15-25°C) 进行所有离心操作。

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 A1 应储存于 4°C。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 1.5 mL 和 2.0 mL 离心管
- 15 mL 离心管
- 小型台式离心机或真空负压装置 (若使用负压离心步骤)

操作步骤 (离心法)

对于 1-4 mL 菌液, 减少 Buffer A1, B1, N1 的体积至 250 µL, 250 µL 和 350 µL; DNA Wash Buffer, Elution Buffer 使用量不变。

1. 接种新鲜的单个菌落到 5-12 mL LB 培养基 (含适量抗生素), 37°C 震荡培养 14-16 h。

注: 不建议过长时间孵育 (16 h 以上), 否则大肠杆菌开始裂解, 质粒产量可能降低。

注: 请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

注: 本说明书操作步骤适用于标准 LB (Luria Bertani) 培养基培养的大肠杆菌中质粒的提取。若采用的是富集培养基, 如 TB 或 2 x YT, 注意 OD₆₀₀ 不要超过 3.0, 同时 Buffer A1/B1/N3 应加大使用量。

2. 12,000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。

注: 若没有高速离心管, 可使用 15 mL 锥形管, 6,000 rpm 离心 10 min。或者, 菌液也可以在多个 2 mL 离心管内离心收集。

3. 加入 450 µL Buffer A1 (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。

注: 充分重悬对于细菌裂解和裂解液中和是至关重要的。

4. 加入 450 µL Buffer B1, 轻轻地反转 10 次以混匀 (不要涡旋), 室温静置 5 min。如有必要, 继续颠倒管子直至溶液变得澄清。

注: 静置时间不要超过 5 min。

注: Buffer B1 低于室温时会沉淀, 请于 37°C 水浴加热至沉淀完全溶解, 溶液澄清。

5. 加入 550 µL Buffer N1, 立即反转 5-10 次以混匀。

注: 冰上裂解 1 min 将会提高得率。

注: 若混合物仍然呈团块、褐色、粘稠状, 一定要混合均匀, 需要更充分混匀来完全中和。

6. 12,000 rpm 离心 10 min。

注: 若裂解液不澄清, 将管子转一个角度, 再离心 5 min, 然后转移上清液至 Mini Column。

7. 将 Mini Column 插入至 2 mL Collection Tube。

8. 小心转移 **700 µL** 澄清的裂解液至 **Mini Column** 内, 避免吸到沉淀, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。小心转移剩余的混合液至 **Mini Column**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

9. **可选:** 加入 **500 µL Buffer KB** 至 **Mini Column**, 12,000 rpm 离心 1 min, 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。

10. 加入 **600 µL DNA Wash Buffer**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

可选: 重复步骤 **10**。

11. 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**, 打开柱盖, 12,000 rpm 离心 2 min。

注: 开盖离心可去除残留乙醇, 该步骤至关重要。

12. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管, 在膜中央加入 **100-150 µL Elution Buffer** 或无菌 ddH₂O, 静置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

可选: 将洗脱下来的液体重新上柱, 再次离心, 可提高产量。

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到另外 20-30%的 DNA。

注: 纯化得到的 DNA 可用于下游应用例如克隆/亚克隆, RFLP, 文库构建, 体外翻译, 测序, HEK293 细胞的转染。

注: 若质粒 DNA 用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染或显微注射, 推荐 PD1212。

13. DNA 浓度的确定,

浓度 (µg/mL) = OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数

操作步骤 (负压/离心法)

1. 根据制造商指南安装负压设备, 将 **Mini Column** 连接到负压装置上。

2. 按照离心步骤 **1-6** 进行操作。

3. 小心转移上清液至 **Mini Column** 中, 打开负压装置, 允许裂解液通过柱子。

4. **可选:** 加入 **500 µL Buffer KB**, 打开负压装置, 允许液体通过柱子。

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。

5. 加入 **600 µL DNA Wash Buffer**, 打开负压装置, 允许液体通过柱子。关闭负压装置。

可选: 重复步骤 **5**。

6. 打开负压装置, 干燥柱子 5 min。

7. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管, 在膜中央加入 **100~150 µL Elution Buffer** 或无菌 ddH₂O, 静置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

可选: 将洗脱下来的液体重新上柱, 再次离心, 可提高产量。

注: 建议使用 **Elution Buffer** 洗脱而不是无菌 ddH₂O, 有利于质粒稳定保存。如果使用无菌 ddH₂O, 确保无菌 ddH₂O 的 pH 值不低于 7.0 (7.0-8.5 最佳), NaOH 可用于调节无菌 ddH₂O 的 pH 值。为了长久保存质粒, 请使用 **Elution Buffer** 洗脱。

注: 纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如克隆, RFLP, 文库构建, 体外翻译, 测序, HEK293 细胞的转染。

低拷贝质粒/柯斯质粒的纯化

从过夜培养的菌液中纯化得到的低拷贝质粒的得率大约为 0.1-1

µg/mL, 若要提取中低拷贝数的质粒 DNA, 请遵循以下准则:

- 培养体积: 使用高拷贝质粒菌培养基的 2 倍体积。
- 使用 2 倍体积的 **Buffer A1, B1, N1**, 这些缓冲液可单独向 **Biomiga** 购买。
- 使用与高拷贝质粒菌相同体积的 **DNA Wash Buffer, Elution Buffer**。

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 B1 后充分混匀。
		如果瓶盖没拧紧, 重配 Buffer B1 (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。
	质粒拷贝数低	增加培养基和 Buffer A1, B1, N1 的体积。
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 B1 后超过 5 min	加入 Buffer B1 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 A1	在 Buffer A1 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.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com