

全能型质粒小提试剂盒简明说明书 (BW-PD1228)

Ver: 1904

产品简介

本试剂盒适用于从 1-12 mL 大肠杆菌培养液中提取质粒, 用于所有可能的下游应用。您可从以下四个方案中任选一个操作。

该试剂盒的特色,

- 最高得率: 每次至多可获得 120 µg 质粒 (方案II)
- 处理快速: 10 min (方案III)
- 高纯度: 转染级别 (方案IV)
- 环境友好型: 没有离液盐 (方案III)
- 对研究人员安全: 无离液盐 (方案III)

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Mini Columns (White ring)	10	50	250
Lysate Clearance Columns (Green ring)	2	10	50
2 mL Collection Tubes	10	50	250
Buffer A1	5 mL	27 mL	135 mL
Buffer B1	5 mL	27 mL	135 mL
Buffer N1	6 mL	33 mL	165 mL
Buffer N3	3 mL	12 mL	60 mL
Buffer KB	6 mL	30 mL	150 mL

Buffer RET	1 mL	6 mL	30 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	15 mL	3×24 mL
EndoFree Elution Buffer	2 mL	9 mL	45 mL
RNase A (20 mg/mL)	25 µL	135 µL	675 µL
User Manual	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-PD1228-00) 或 60 mL (BW-PD1228-01) 或 96 mL (BW-PD1228-02) 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。
- 室温下 (15-25°C) 进行所有离心步骤。

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)。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 高速离心机
- 1.5 mL 高速离心管
- 2 mL 离心管

方案I (1-5 mL 菌液)

1. 收集 **1-5 mL** 新鲜菌液, 通过 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。

2. 加入 **250 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: 充分重悬有利于菌体裂解和中和。

3. 加入 **250 µL Buffer B1**, 轻轻地反转 10 次以混匀 (不要涡旋), 室温静置 5 min。

注: 静置时间不要超过 5 min。

4. 加入 **350 µL Buffer N1**, 立即反转/振荡 5 次以混匀。12,000 rpm 离心 10 min。

注: 将溶液混匀非常重要, 若混合物仍然呈团块、褐色或粘稠状, 需要更充分混匀才能完全中和溶液。

5. 小心将上清液转移至 **Mini Column (White ring)** 中, 避免吸到沉淀, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

注: 若裂解液不澄清, 可再离心 5 min 后转移至 **Mini Column**。

6. **可选:** 加入 **500 µL Buffer KB**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

注: 此步骤对于 *end A+* 菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的, 而对于 *end A-* 菌株例如 DH5α 和 TOP10 是不必要的。

7. 加入 **500 µL DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

可选: 重复步骤 7。

8. 将 **Mini Column** 开盖放回至 **2 mL Collection Tube**, 12,000

rpm 离心 2 min。

注：残留的乙醇可通过打开柱盖离心的方式去除。

9. 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 μ L EndoFree Elution Buffer**，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，二次洗脱。

注：第一次洗脱通常得到 70%左右的质粒。二次洗脱有利于回收剩下 20~30%的质粒 DNA。

10. DNA 浓度可通过以下方式计算，

DNA 浓度 (μ g/mL)=OD₂₆₀×50×稀释倍数

方案II（1-12 mL 菌液）

对于 **1-4 mL** 的菌液，减少 **Buffer A1, B1, N1** 的使用量至 **250 μ L, 250 μ L** 和 **350 μ L**。使用相同体积的 **DNA Wash Buffer** 和 **EndoFree Elution Buffer**。

1. 收集 **5-12 mL** 的新鲜菌液，通过 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。

2. 加入 **450 μ L 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。转移样品至一个 2 mL 离心管。

注：充分重悬有利于菌体裂解和中和。

3. 加入 **450 μ L Buffer B1**，轻轻地反转 10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 5 min 直至溶液变得澄清。

注：静置时间不要超过 5 min。

4. 加入 **550 μ L Buffer N1**，立即反转振荡 5-10 次以混匀。

注：将溶液混匀非常重要，若混合物仍然呈团块、褐色或粘稠状，需要更充分混匀才能完全中和溶液。

5. 12,000 rpm 离心 10 min。

6. 小心将 **700 μ L** 上清液转移至 **Mini Column (White ring)**中，避免吸到沉淀，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

注：若裂解液不澄清，可再离心 5 min 后转移至 **Mini Column**。

7. 小心转移剩余的裂解液至 **Mini Column**，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

可选：加入 **500 μ L Buffer KB**，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

注：此步骤对于 *end A+* 菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的，而对于 *end A-* 菌株例如 DH5 α 和 TOP10 是不必要的。

8. 加入 **600 μ L DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇)，12,000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

可选：重复步骤 8。

9. 将 **Mini Column** 开盖放回至 **2 mL Collection Tube**，12,000 rpm 离心 2 min。

10. 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 μ L EndoFree Elution Buffer**，静置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

可选：将洗脱下来的液体二次上柱，再次离心可提高得率。

注：第一次洗脱通常得到 70%左右的质粒。二次洗脱有利于回收剩下 20~30%的质粒 DNA。

方案III（快速小提：1-2 mL 菌液）

1. 收集 **1-2 mL** 新鲜菌液，通过 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。

2. 加入 **200 μ L 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：充分重悬有利于菌体裂解和中和。

3. 加入 **200 μ L Buffer B1**，轻轻地反转 10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 2 min 直至溶液变得澄清。

注：静置时间不要超过 5 min。

4. 加入 **200 μ L Buffer N3**，立即颠倒振荡 5 次以混匀。室温静置 2 min，转移混合液至一个 **Lysate Clearance Column (Green ring)**。

5. 10,000 rpm 离心 30 s。

注：若裂解液依旧留在柱子内，再离心 30 s。

6. 丢弃 **Lysate Clearance Column**，加入 200 μ L 无水乙醇至含滤液的 **2 mL Collection Tube**，吹打混合均匀，转移 750 μ L 澄清裂解液至 **Mini Column (White ring)**。

7. 12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。

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

注：此步骤对于 *end A+* 菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的，而对于 *end A-* 菌株例如 DH5 α 和 TOP10 是不必要的。

9. 加入 **600 μ L DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇)，12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。

可选：重复步骤 9。

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

注：开盖离心有助于更好地去除残留乙醇。

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：将洗脱下来的液体二次上柱，再次离心可提高得率。

注：第一次洗脱通常得到 70%左右的质粒。二次洗脱有利于回收剩下 20~30%的质粒 DNA。

注：此方案只提供了少量的 Lysate Clearance Column，若您需要，可单独购买快速质粒小提试剂盒（BW-PD1218）。

方案IV（无内毒素质粒小提：1-5 mL 菌液）

1. 收集 **1-5 mL** 新鲜菌液，通过 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。

2. 加入 **250 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：充分重悬有利于菌体裂解和中和。

3. 加入 **250 µL Buffer B1**，轻轻地反转 10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 5 min 直至溶液变得澄清。

注：静置时间不要超过 5 min。

4. 加入 **60 µL Buffer N3**，立即颠倒/振荡 5 次以混匀。

注：将溶液混匀非常重要，若混合物仍然呈团块、褐色或粘稠状，需要更充分混匀才能完全中和溶液。

5. 12,000 rpm 离心 10 min。

6. 小心将上清液转移至一个干净的 1.5 mL 离心管，加入 **1 倍体积**的 **Buffer RET**（例如，500 µL 的 Buffer RET 加入至 500 µL 的裂解液中）和 250 µL 无水乙醇，手动剧烈震荡 3 次以混匀。

7. 转移 700 µL 的上述混合液至 **Mini Column (White ring)**，12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。再将剩余的上述混合液转移至 **Mini Column**，

12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

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

注：此步骤对于 *end A+* 菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的，而对于 *end A-* 菌株例如 DH5α 和 TOP10 是不必要的。

8. 加入 **500 µL DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇)，12,000 rpm 离心 30 s，弃滤液。

可选：重复步骤 8。

9. 12,000 rpm 离心 1 min。

注：残留的乙醇可通过打开柱盖离心的方式去除。

10. 将 **Mini Column** 转移至一个无菌的 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 1 min 洗脱质粒 DNA。

可选：将洗脱下来的液体重新上柱，二次洗脱。

注：第一次洗脱通常得到 70%左右的质粒。二次洗脱有利于回收剩下 20~30%的质粒 DNA。

注：对于方案IV，本试剂盒只提供了少量 Buffer RET，若您需要更多，建议单独购买无内毒素质粒小提试剂盒（BW-PD1220）。

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