****

**过滤法无内毒素快速质粒中提试剂盒简明说明书（BW-PD1422）**

***Ver: 1912***

**产品简介**

本试剂盒采用专利DNA结合系统，Midi 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EndoFree Elution Buffer洗脱。纯化后的质粒DNA不含胍盐/阴离子交换树脂残基。

本试剂盒使用一种特殊配方的缓冲液，可从质粒DNA中提取内毒素。内毒素水平低至1-10 EU每1 μg质粒DNA。

本试剂盒适用于从15-50 mL大肠杆菌培养液中提取质粒，提供的Midi Column可结合至多250 μg质粒DNA。纯化得到的无内毒素质粒可用于下游应用，例如内毒素敏感细胞系、原代培养细胞的转染或显微注射。

**产品贮存及稳定性**

本试剂盒自之日起可保存12个月。所有试剂及用品可保存于室温（15-25℃）。加入RNase A后的Buffer A1后应储存于4℃。

**产品构成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Catalog#** | **-00** | **-01** | **-02** |
| Preps | 2 | 10 | 25 |
| Midi Columns | 2 | 10 | 25 |
| 15 mL Collection Tubes | 2 | 10 | 25 |
| ezFilter Syringe (20 mL) | 2 | 10 | 25 |
| Buffer GBL | 3 mL | 12 mL | 30 mL |
| Buffer A1 | 6 mL | 30 mL | 70 mL |
| Buffer B1 | 6 mL | 30 mL | 70 mL |
| Buffer N3 | 2 mL | 10 mL | 24 mL |
| Buffer RET | 6 mL | 30 mL | 70 mL |
| DNA Wash Buffer\* | 3 mL | 12 mL | 30 mL |
| EndoFree Elution Buffer | 3 mL | 15 mL | 40 mL |
| RNase A (20 mg/mL) | 30 μL | 150 μL | 350 μL |
| User Manual | 1 | 1 | 1 |

**要点**

* RNase A：20 mg/mL。室温下（15-25℃）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℃保存。
* DNA Wash Buffer：使用前请将12 mL (BW-PD1422-00)或48 mL (BW-PD1422-01)或120 mL (BW-PD1422-02) 96-100%乙醇加入至DNA Wash Buffer瓶内。
* Buffer B1：低于室温时会沉淀，请于37℃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。
* Buffer N3在保存时可能形成沉淀，使用前请于37℃水浴加热溶解。
* 确保离心机转速可达12,000 ×g。
* 在室温下（15-25℃）进行所有离心操作。

**实验前需准备的材料**

* 96-100%乙醇
* 高速离心机
* 15 mL离心管

**操作步骤（过滤法）**

1. 接种新鲜的100 µL菌液到***15-50 mL*** LB培养基（含适量抗生素），37℃震荡培养14-16 h。

**注：**不建议培养时间超过16 h，可能会导致大肠杆菌裂解从而降低质粒产量。

**注：**请勿从冻存的甘油菌直接培养。

**注：**请勿使用保存于4℃的菌液。

**注：**请勿使用超过50 mL的菌液或者细胞量大于150。若超过50 mL菌液量，对应Buffer的使用量应加大。

**注：**此步骤适用于LB培养的大肠杆菌，当使用TB或者2xYT培养基时，需要特别注意OD600不要超过3.0。当使用了过量的培养基，对应的Buffer的体积需要对应增加。

1. 柱平衡：向吸附柱**Midi Columns** 中加入**1mL Buffer GBL**，10,000 xg 离心1分钟，弃去收集管中的滤液，将吸附柱重新放回收集管中备用。（处理完请于当天使用）。
2. 5,000 xg离心10 min，弃上清，将管子倒置于纸巾上，去除残留培养基。

**注：**残留培养基将造成裂解不充分及低的产量。

1. 加入**2.5 mL** **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：**充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的。

1. 加入**2.5 mL Buffer B1**，轻轻地反转10次以混匀（不要涡旋），室温静置5 min直至获得澄清的裂解液。

**注：**静置时间不要超过5 min，时间过长会导致基因组污染或质粒损伤。

**注：**Buffer B1低于室温时易产生沉淀，使用前请于37℃温浴溶解。

1. 加入**750 μL Buffer N3**，立即反转或震荡5-10次混匀。

**注：**冰上静置1 min有助于增加产量。

**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。

1. 两种方案可供选择：

**高速离心：**将裂解液转移至一个高速离心管，12,000 ×g离心10-15 min。将澄清的裂解液转移至一个15 mL离心管（避免吸到漂浮的沉淀）

**注：**若离心机转子是冷的，室温静置10 min，然后按照说明书操作离心。

**使用Filter Syringe**：将裂解液直接倒入Filter Syringe，将Filter Syringe插入一个干净的架在架子上的15 mL离心管（未提供），静置10 min，可看见白色沉淀漂浮至顶部。握住Filter Syringe和15 mL离心管，轻轻推动助推器至底部，当阻力太大时停止下压，可能在Filter Syringe内留下部分裂解液，不要强迫残留的裂解液通过Filter Syringe。

1. 小心将上清液转移至一个干净的15 mL离心管中（避免吸到沉淀），加入**2.5 mL Buffer RET**和**2.5 mL**无水乙醇，剧烈震荡以混匀，将混合液转移至DNA柱。
2. 转移4 mL的混合液至**Midi Column**（插在**15 mL Collection Tube**），10,000 xg离心1 min。弃滤液，将**Midi Column**放回**15 mL Collection Tube**。再将剩余的混合液上柱，10,000 xg离心1 min。弃滤液并将柱子放回收集管中。

**注：**Midi Column最大可容纳5 mL液体，若混合液有5 mL，请于室温静置2-5 min（避免离心过程中液体撒出）。

1. 加入**4 mL DNA Wash Buffer**至**Midi Column**，10,000 xg离心1 min，弃滤液。
2. 加入**4 mL** 100%乙醇，10,000 xg离心1 min，弃滤液。
3. 将**Midi Column**开盖，放回15 mL离心管中，10,000 xg离心10 min。

**注：**残留的乙醇可通过打开柱盖离心的方式去除，乙醇是否去除干净至关重要。

1. 将**Midi Column**转移至一个干净的**15 mL** **Collection Tube**，在膜中央加入**0.3-0.5 mL EndoFree Elution Buffer**（65℃预热）或无菌ddH2O，室温静置1 min，10,000 xg离心5 min洗脱质粒DNA。

**可选：**将洗脱下来的液体二次上柱洗脱。

**注：**第一次洗脱可得到约70%质粒DNA，将洗脱下来的DNA二次上柱可得到另外20-30%的DNA。

**注：**纯化得到的质粒DNA可直接用于下游实验例如基因克隆/亚克隆、RFLP、文库筛选、体外翻译、测序、HEK293细胞的转染等。

**注：**若用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射，强烈建议使用去除内毒素试剂盒。

1. DNA浓度可通过以下方式计算，

DNA浓度（μg/mL）=OD260nm×50×稀释倍数

**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。最高使用100 mL。
* 使用2倍体积的Buffer A1，B1，N3和RET。这些额外的缓冲液可单独向Biomiga购买。
* 使用与高拷贝质粒菌相同体积的DNA Wash Buffer，EndoFree 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℃。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和RET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](http://www.biomiga.com.cn/)

**400-115-2855**

sales@beiwobiomedical.com