****

**快速型无内毒素质粒中提试剂盒简明说明书（PD2468）**

**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Elution Buffer洗脱。

不同于市场上其他试剂盒，我们的试剂盒缓冲液系统内不含离液盐，纯化后的质粒DNA不含胍盐/阴离子交换树脂残基。

传统方法分离的质粒通常含有高水平的内毒素（脂多糖），对于内毒素敏感细胞系转染或显微注射，应先清除内毒素。该系统使用一种特殊配方的缓冲液，可从质粒DNA中提取内毒素。两轮提取可将内毒素水平降低至0.1 EU每1 μg质粒DNA。

本试剂盒适用于从15-50 mL大肠杆菌培养液中快速提取质粒，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℃）。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 |
| Filter syringe | 2 | 10 | 25 |
| 2 mL Microfuge Tubes | 4 | 20 | 50 |
| Plastic wrench | 1 | 1 | 1 |
| 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 | 3 mL | 15 mL | 30 mL |
| Buffer RET | 12 mL | 60 mL | 135 mL |
| DNA Wash Buffer\* | 15 mL | 54 mL | 2×54mL |
| RNase A (20 mg/mL) | 30 µL | 150 µL | 350 µL |
| Endofree Elution Buffer |  4 mL | 20 mL | 60 mL |
| User Manual | 1 | 1 | 1 |

**要点**

* RNase A：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60 mL (PD2468-00)或216 mL (PD2468-01)或216 mL (PD2468-02) 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℃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低于10℃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（12,000 rpm），特别是当裂解液与乙醇混合后，需要立即离心处理。
* 当加入裂解液时，确保Midi Column拧紧（使用Plastic wrench）。
* 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
* 50 mL高速离心管
* 50 mL锥形管
* 异丙醇（用以沉淀质粒DNA）

**操作步骤（离心法）**

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：**制备初始培养菌液的最佳方法：从新鲜的选择性培养基上挑取新鲜的单菌落至含有适量抗生素的1 mL LB培养基内，37℃，震荡（约250 rpm）培养6-8 h。

**注：**请勿使用超过50 mL的菌液。若菌液体积超过100 mL，请增大对应buffer的使用量。

1. 5,000 x g离心10 min，弃上清，将管子倒置于纸巾上，去除残留培养基。
2. 柱平衡：向吸附柱**Midi Column** 中加入**1 mL Buffer GBL**，使用柱塞使滤液通过并弃去滤液，将吸附柱处于备用状态（处理完请于当天使用）。
3. 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。（充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的）
4. 加入**2.5 mL Buffer B1**，轻轻地反转10次以混匀，室温静置5-10 min直至获得澄清的裂解液。完全裂解对DNA产量很重要。

**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**1 mL Buffer N3**，立即反转5次，手动震荡5次混匀。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。
2. 提供2种过滤裂解液的方式：

高速离心机：转移裂解液至高速离心管，12,000 rpm（14,000-18,000 x g）离心15 min。转移裂解液至一个50 mL锥形管。

 Filter syringe：将**Filter syringe**插入至置于架子上的一个干净的50 mL离心管（自备），将裂解液直接倒入**Filter syringe**，静置10 min。可看到白色沉淀物漂浮在上方。将**Filter syringe**固定在50 mL管上方，轻轻推动柱塞，将裂解液排出，当阻力过大可停止，不要强迫裂解液通过**Filter syringe**，可能会有些裂解液仍留在絮状沉淀中。

**注：**为了避免Filter syringe堵塞，使用少于50 mL过夜菌液，加入Buffer N3后混合均匀。可将裂解液通过Filter syringe过滤。Filter syringe可向Biomiga单独购买。

1. 加入**1倍体积**的**Buffer RET**和3 mL无水乙醇（例如，5 mL Buffer RET加入至5 mL裂解液），手动剧烈震荡5次混匀。
2. 转移混合液至**Midi Column**（插在**50 mL Collection Tube**），使用柱塞使裂解液通过。

**注：**当裂解液通过时，请确保Midi Column是拧紧的（使用Plastic wrench）。

1. 用**Plastic wrench**将膜柱从**Midi Column**卸下，将柱塞从**Midi Column**取出，用相同的膜柱组装**Midi Column**，并加入剩余的裂解液，将柱塞排出，直至所有裂解液通过。

**注：**取出柱塞前，请务必将膜柱从Midi Column卸下，否则，柱内外压力差会使膜破裂。

1. 加入**10 mL DNA Wash Buffer**，（取出柱塞前将膜柱从Midi Column取出），使用柱塞将溶液排出。重复步骤**10**。
2. 使用**Plastic wrench**（提供），将膜柱从**Midi Column**卸下，转移至一个2 mL 管内。
3. 12,000 rpm离心1 min，弃滤液，将**Midi Column**放回收集管，最大转速离心2 min，室温干燥3-10 min。
4. 将**Midi Column**转移至一个干净的1.5 mL离心管或**2 mL Microfuge Tube**，在膜中央加入**500 μL Endofree Elution Buffer**（预热 Endofree Elution Buffer至60℃有助于提高得率），室温静置1 min，12,000 rpm离心1 min洗脱质粒DNA。再加入**300 μL Endofree Elution Buffer**，室温静置1 min，12,000 rpm离心1 min。
5. 重复步骤**13**以提高得率。
6. 可选：将洗脱下来的液体重新上柱进行二次洗脱。第一次洗脱可得到大约60-70%质粒DNA，二次洗脱可得到剩余20-30%的DNA。

**注：**纯化得到的质粒DNA可直接用于下游实验例如克隆，HEK293细胞转染。

**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，RET和100%乙醇的体积。 |
| 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

 ****