****

**快速型无内毒素质粒大提试剂盒简明说明书（PD1520）**

***Ver: 2405***

**产品构成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Catalog#** | **-00** | **-01** | **-02** |
| Preps | 2 | 10 | 25 |
| Maxi Columns | 2 | 10 | 25 |
| 50 mL Collection Tubes | 2 | 10 | 25 |
| Buffer GBL | 8 mL | 30 mL | 70 mL |
| Buffer A1 | 22 mL | 110 mL | 270 mL |
| Buffer B1 | 22 mL | 110 mL | 270 mL |
| Buffer N3 | 10mL | 40mL | 90mL |
| Buffer RET | 22 mL | 110 mL | 270 mL |
| DNA Wash Buffer\* | 5 mL | 24 mL | 54 mL |
| EndoFreeElution Buffer | 5 mL | 25 mL | 60 mL |
| RNase A (20 mg/mL) | 110 μL | 550 μL | 1.35 mL |
| User Manual | 1 | 1 | 1 |

**产品简介**

本试剂盒采用专利DNA结合系统，Maxi 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。

该系统使用一种特殊配方的缓冲液，可从细菌裂解液中提取内毒素。内毒素水平低至1-10 EU每1 μg质粒DNA。

本试剂盒适用于从150-200 mL大肠杆菌培养液中提取质粒，提供的Maxi Column可结合至多1200 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℃。

**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20 mL (PD1520-00)或96 mL (PD1520-01)或216 mL (PD1520-02)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，特别是当裂解液与乙醇混合后，需要立即离心处理。
* 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
* 高速离心机或负压装置
* 50 mL离心管

**操作步骤（离心法）**

**注：**本试剂盒提供的溶液量是根据OD600介于2.0-3.0的高拷贝质粒的200 mL菌液提供，若有需要，可联系Biomiga购买。

1. 接种新鲜的100 µL菌液到***150-200 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：**请勿使用保存在4℃的菌液作为初始菌液。

**注：**请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

**注：**请勿使用超过200 mL的菌液或者细胞量大于550，否则请增大对应buffer的使用量。

1. 柱平衡：向吸附柱**Maxi Column** 中加入**2.5mL Buffer GBL**，8,000 ×g 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 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。
3. 加入**10 mLBuffer 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**10 mL Buffer B1**，轻轻地反转5-10次以混匀（不要涡旋），如有必要，请继续颠倒混匀直至溶液变得稍微澄清，室温静置5 min直至获得澄清的裂解液。
5. 加入**3 mL Buffer N3**，立即手动震荡5-10次混匀，转移裂解液至高速离心管，12,000 x g离心10 min。

**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。

**注：**若菌液的RNA量较多，可静置10 min使RNA酶充分发挥作用。

**注：**若没有高速离心机，可用Filter syringe（PD1522提供，或向Biomiga购买）过滤裂解液。

1. 小心将20 mL上清液转移至一个干净的50 mL离心管中（避免吸到沉淀），加入**10 mL**的**Buffer RET**和10 mL无水乙醇，手动剧烈震荡5次混匀。

**注：**增加Buffer RET的使用量可减少质粒DNA内毒素的水平，然而DNA的得率可能会受影响。可依据下游实验来调节Buffer RET的使用量。

1. 转移18 mL的混合液至预处理**Maxi Column**，8,000 x g离心1 min。弃滤液，将**Maxi Column**放回收集管。重复步骤**8**直至所有混合液通过。

**注：**若50 mL Collection Tube与离心机转子不匹配（例如，转子盖子不能盖住），可通过台式离心机>2,500 x g离心5 min。

1. 加入**10 mL DNA Wash Buffer**，8,000 x g离心1 min，弃滤液，将**Maxi Column**放回收集管，重复步骤**9**。
2. 加入10 mL无水乙醇，8,000 x g离心1 min。弃滤液，将**Maxi Column**放回收集管。
3. 打开柱盖，10,000 x g离心10 min。该步骤可去除残留乙醇，以便获得最佳洗脱。再将柱子放入50-60℃烘箱10min将有利于更好的去除乙醇并增加洗脱效率。

**注：**残留乙醇会影响DNA的洗脱，若离心转速低于5,000 x g，离心20 min以彻底去除残留乙醇。

1. 将**Maxi Column**转移至一个干净的50 mL离心管，在膜中央加入**1.5-2.0 mL Endofree Elution Buffer**，静置1 min，10,000 x g离心5 min洗脱质粒DNA。
2. 为提高质粒收获量可将洗脱下来的液体重新上柱，室温静置1 min，10,000 x g离心5 min。

**注：**纯化得到的质粒DNA可直接用于下游实验例如克隆/亚克隆，RFLP，文库构建，体外翻译，测序，转染及显微注射。

**注：**二次洗脱可增加DNA产量。

1. 可选：替代步骤12，为了最佳得率，请加入4.0-5.0 mL Endofree Elution Buffer，室温静置5 min，10,000 x g离心5 min，将洗脱下来的液体二次上柱，可获得最大的DNA产量。

**注：**对于DNA浓度，加入0.1倍体积的3 M KAc或NaAc（pH5.2），和0.7倍体积的异丙醇，最大速度离心10 min，弃上清。加入1 mL 70%乙醇，离心5 min，小心弃上清，室温干燥20 min去除残留乙醇，用Endofree Elution Buffer重悬DNA沉淀。

DNA浓度（µg/mL）=OD260 nm×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。大提最高使用400 mL。
* 使用2倍体积的Buffer A1，B1，N3，RET以及100%乙醇，Buffer A1，B1，N3，RET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，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

 ****