****

**无内毒素96孔质粒小提试剂盒（过滤法）**

**（BW-PD1818）**

***Ver: 2310***

**产品简介**

试剂盒采用本司特殊的质粒结合系统、过滤系统以及去内毒素方法，单次可纯化96个高质量、低内毒素的质粒，具有高通量、高效率和高质量的特点。

**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应储存于4℃。

**实验前需准备的材料**

* 96-100%乙醇
* 96孔深孔板真空负压装置
* 96孔深孔板离心装置
* 96孔深孔板（2.2mL）
* 烘箱（70℃）

**安全提示**

Buffer N3、Buffer RET和Buffer KB属于高盐溶液，请注意带手套操作

**产品构成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Catalog# | BW-PD1818-00 | BW-PD1818-01 | BW-PD1818-02 |
| Preps | 96 | 96 x 4 | 96 x 20 |
| 96-Deep Well Plates (1.6 mL) | 1 | 4 | 20 |
| 96-Well DNA Plates | 1 | 4 | 20 |
| 96-Well Lysate Clearance Plates | 1 | 4 | 20 |
| 96-Well Elution Plates | 1 | 4 | 20 |
| Breathable Films | 1 | 4 | 20 |
| Sealing Films | 4 | 16 | 80 |
| Buffer GBL | 60 mL | 240 mL | 2 x 500 mL |
| Buffer A1 | 30 mL | 110 mL | 2 x 300 mL |
| Buffer B1 | 30 mL | 110 mL | 2 x 300 mL |
| Buffer N3 | 15 mL | 60 mL | 300 mL |
| Buffer RET | 30 mL | 110 mL | 2 x 270 mL |
| DNA Wash Buffer | 40 mL | 2 x 80 mL | 8 x100 mL |
| Buffer KB | 55 mL | 240 mL | 3 x 400 mL |
| EndoFree Elution Buffer | 25 mL | 100 mL | 450 mL |
| RNase A(20mg/mL) | 150 μL | 550 μL | 2 x 1.5 mL |
| Use 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160 mL (BW-PD1818-00) or 320 mL (BW-PD1818-01) or 400 mL (BW-PD1818-02) 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保存时可能会形成沉淀，加热至37℃可溶解。
* 在室温下（15-25℃）进行所有离心操作。

**操作步骤（离心法）**

1. 将单个菌落分别接种到含有***1-1.5 mL*** LB培养基（含适量抗生素）的96孔板（2.2mL）中，覆膜后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：**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96-Well DNA Plates每孔 中加入**500μL Buffer GBL**，3000xg离心5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. 将摇菌板覆膜后室温下，3,000 x g 离心 10 min，收集菌体，将上清倒掉，并将 96 孔板倒扣在纸巾上以除去残留的培养基。

**注：**残留的培养基将会导致裂解不充分从而造成低DNA得率。

1. 每孔加入**250 μLBuffer 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。

1. 每孔加入**250 μL Buffer B1**，轻轻地反转10次以混匀（不要涡旋），室温静置2~3 min。

**注：**静置时间不要超过5 min。

**注：**Buffer B1低于室温会结晶，使用前在37℃预热Buffer B1使沉淀溶解。

1. 每孔加入**125μL Buffer N3**，立即反转/震荡5-10次以混匀。

**注：**冰上孵育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. 将**96-Well Lysate Clearance Plates**放置于**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**上，小心将裂解液转移至**96-Well Lysate Clearance Plates**，静置10分钟，待白色絮状物漂浮至液面上方，放置于板式离心机3,000×g离心5 min。

**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。

1. 向**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**上清中加入**250 μLBuffer RET**和**250 μL**的100%乙醇，覆膜后，手动震荡以混匀。
2. 转移上述混合液至**96-Well DNA Plates**中，转移结束后将**96-Well DNA Plates**放于**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**上方，3000 ×g离心5 min，**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**滤液去除，将**96-Well DNA Plates**放回**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**。
3. **可选：**加入**500 µL Buffer KB**至**96-Well DNA Plates**，3000 ×g离心5 min，弃滤液，将将**96-Well DNA Plates**放回**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**。

**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。

1. 加入**700 µL DNA Wash Buffer**（使用前按要求加入乙醇），3000 ×g离心5 min，弃滤液，将**96-Well DNA Plates**放回**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**。
2. 重复步骤**10**。
3. 将**96-Well DNA Plates**放置于通风橱中，将多余的乙醇挥发出去，或者可将将**96-Well DNA Plates**放置于70℃烘箱中10分钟。

**注：**该步骤至关重要，去除残留乙醇。

1. 将**96-Well DNA Plate**放置在**96-Well Elution Plates**上，在膜中央加入**100 μL~150μL**无热原水或**EndoFree Elution Buffer**（65℃预热），静置2min，3000×g离心5 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：**第一次洗脱可得到约70%的质粒DNA，二次洗脱可回收到剩余20-30%的质粒。

**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：**质粒DNA可用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染或显微注射。

1. DNA浓度的确定，

DNA浓度（μg/mL）=OD260nm×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，将连接到负压装置上。
2. 按照离心步骤**1-5**进行操作。
3. 先将**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**放置在装置中，再将**96-Well Lysate Clearance Plates**放置其上方，将裂解液转移至**96-Well Lysate Clearance Plates**中，静置10分钟，待白色絮状物漂浮至液面上方，打开负压装置，收集流穿液。
4. 向**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**上清中加入**250 μLBuffer RET**和**180 μL**的100%乙醇，覆膜后，手动震荡以混匀。
5. 转移上述混合液至**96-Well DNA Plates**中，转移结束后将**96-Well DNA Plates**放于**96-Deep Well Plates (1.6 mL)**上方，打开负压装置，弃滤液；
6. **可选：**加入**500 μL Buffer KB**至**96-Well DNA Plates**，打开负压装置，弃滤液。

**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。

1. 加入**700 μL DNA Wash Buffer** ，打开负压装置，弃滤液。关闭负压装置。

重复步骤**7**。

1. 打开负压装置，空抽5 min以干燥柱子，去除乙醇残留。
2. 将**96-Well DNA Plate**放置在**96-Well Elution Plates**上，在膜中央加入**100 μL~150μL**无热原水或**EndoFree Elution Buffer**（65℃预热），静置2min，打开负压装置洗脱质粒DNA。

**可选：**将洗脱下来的液体重新上柱，二次洗脱。

**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，N3和RET，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，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 | 增加培养基和对应Buffer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 | Buffer A1中未加RNase A | 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。 |
| **96孔过滤板堵塞** | 加入N3试剂后没混匀或没待絮状沉淀上浮至上方 | 上下颠倒混匀，结束后涡旋10秒；静置5-10分钟，待絮状沉淀漂浮至上方再打开负压装置。 |

 **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

 ****