****

**10分钟快速去内毒素质粒小提试剂盒简明说明书（BW-PD1219）**

***Ver: 1904***

**产品简介**

本试剂盒的关键在于使用专利Lysate Clearance Column，使得1-2 mL大肠杆菌菌液在30秒内过滤裂解液。整个提取过程仅需要10分钟。而且缓冲液系统中不含离液盐，它是目前市场上唯一一种基于玻纤的环保型质粒小提试剂盒。

该试剂盒使用一种独特的缓冲液，可从质粒DNA中去除内毒素。纯化得到的质粒可用于下游应用例如内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射。

**产品构成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Catalog#** | **-00** | **-01** | **-02** |
| Preps | 10 | 50 | 250 |
| Mini Columns (White ring) | 10 | 50 | 250 |
| Lysate Clearance Columns (Green ring) | 10 | 50 | 250 |
| 2 mL Collection Tubes | 10 | 50 | 250 |
| Buffer GBL | 8 mL | 30 mL | 150 mL |
| Buffer F1 | 2.4 mL | 12 mL | 60 mL |
| Buffer F2 | 2.4 mL | 12 mL | 60 mL |
| Buffer F3 | 2.4 mL | 12 mL | 60 mL |
| Buffer RET | 2.4 mL | 12 mL | 60 mL |
| Buffer KB | 6 mL | 30 mL | 150 mL |
| DNA Wash Buffer\* | 3 mL | 7 mL | 35 mL |
| Endofree Elution Buffer | 1 mL | 7 mL | 35 mL |
| RNase A (20 mg/mL) | 12 μL | 60 μL | 300 μL |
| User Manual | 1 | 1 | 1 |

**要点**

* Buffer F1：使用前将提供的所有RNase A瞬时离心后加入Buffer F1，Buffer F1/RNase A储存于4℃。
* Buffer F2：若形成沉淀，使用前请于37℃水浴加热至沉淀完全溶解。
* DNA Wash Buffer：使用前请将12 mL（BW-PD1219-00）或28 mL（BW-PD1219-01）或140 mL（BW-PD1219-02）96-100%乙醇加入至每个DNA Wash Buffer瓶内。

**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 F1后应储存于4℃。

**实验前需准备的材料**

* 96-100%乙醇
* 小型台式离心机或真空负压装置
* 1.5 mL离心管

**操作步骤**

1. 12,000 rpm离心1 min收集新鲜的***1-2 mL*** 菌液，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**Mini Column** 中加入**500 μL Buffer GBL**，12,000 ×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）。
3. 加入**200 μL** **Buffer F1 (**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. 加入**200 μL Buffer F2**，轻轻地反转10次以混匀（不要涡旋），室温静置1-2 min直至溶液变得澄清。
2. 加入**200 μL Buffer F3**，立即反转5次以混匀，室温孵育2 min。
3. 转移全部裂解液至**Lysate Clearance Column (Green ring)**，10,000 rpm离心30 s。

**注：**若裂解液仍旧在柱子内，再离心30 s。

1. 丢弃**Lysate Clearance Column**，加入**200 µL Buffer RET**和200 µL 100%乙醇至含有滤液的**2 mL Collection Tube**，用枪头吹打混匀。
2. 小心转移**750 μL**澄清的裂解液至**Mini Column（White ring）（**自带**2 mL Collection Tube）**，12,000 rpm离心30 s，弃滤液，将**Mini Column**放回**2 mL Collection Tube**。重复步骤7直至所有裂解液通过。
3. **可选：**加入**500 µL Buffer KB**，12,000 rpm离心30 s，弃滤液，将**Mini Column**放回**2 mL Collection Tube**。

**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**600 µL DNA Wash Buffer** （使用前确保加入乙醇），12,000 rpm离心30 s，弃滤液。

**可选：**重复步骤**10**。

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

**注：**开盖离心可更加有效地去除残留乙醇。

1. 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：**将洗脱下来的液体重新上柱，二次洗脱。

**注：**第一次洗脱可得到大约70%的质粒DNA，将洗脱下来的溶液二次上柱会回收到另外20-30%的DNA。

1. DNA浓度的确定，

浓度（µg/mL）=OD260×50×稀释倍数

**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 F2后充分混匀。 |
| 如果瓶盖没拧紧，重配Buffer F2 ( 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。 |
| 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 F2后超过5 min | 加入Buffer F2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 F1 | 在Buffer F1 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](mailto:sales@biomiga.com.cn)

****