



Quick-Start Protocol

Ver: 2504

UltraPure Plasmid Miniprep Kit (Anion Exchange Chromatography)

离子交换质粒小提试剂盒

本试剂盒 (Cat. No. **BW-PD5004**) 适用于从 10-50 mL 菌液中快速、高效地提取 100-500 µg 无内毒素的 (内毒素水平 $\leq 0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$) 质粒 DNA, 可用于酶切、测序、转化、转染等下游应用。本试剂盒 4-28°C 保存, 有效期 12 个月。

使用前注意事项

- ☐ RNase A: 使用前请瞬时离心然后加入 Buffer A1 中, 并放置 4°C 保存。
- ☐ 在 Buffer A1 中加入 RNase A 并混合均匀, 混合后 4°C 保存。
- ☐ 若 Buffer B1 产生沉淀, 37°C 水浴 10 分钟使沉淀充分溶解。
- ☐ 【客户自备】70% 酒精、异丙醇。
- ☐ 【客户自备】无内毒素、无热源的 50 mL 离心管及其他耗材。
- ☐ 推荐: LB 培养基, 培养 12-16 小时, OD600 在 2.0~3.0 之间。

推荐试剂用量

试剂名称	菌液体积	
	25 mL	50 mL
Buffer A1 + RNase A	2.5 mL	5 mL
Buffer B1	2.5 mL	5 mL
Buffer N3	2.5 mL	5 mL
Buffer BEQ	5 mL	5 mL

Buffer BWH I	5 mL	8 mL
Buffer BWH II	5 mL	8 mL
Buffer BEL	10 mL	10 mL
Endofree Elution Buffer	0.3 mL	0.3 mL

试剂盒组成

Catalog#	PD5004-00	PD5004-01	PD5004-02
Preps	2	10	25
AEC Column A	2	10	25
ezFilter Syringe (20 mL)	2	10	25
2 mL Microfuge Tubes	4	20	50
Buffer A1	12 mL	25*2 mL	125 mL
Buffer B1	12 mL	25*2 mL	125 mL
Buffer N3	12 mL	25*2 mL	125 mL
Buffer BEQ	12 mL	25*2 mL	125 mL
Buffer BWH I	16 mL	80 mL	200 mL
Buffer BWH II	16 mL	80 mL	200 mL
Buffer BEL	25 mL	100 mL	250 mL
Endofree Elution Buffer	5 mL	10 mL	15 mL
RNase A (60mg/mL)	60 µL	250 µL	650 µL
User Manual	1	1	1



操作步骤

以下步骤中含斜杠的数据，如“**25 mL / 50 mL**”，斜杠前面为25 mL 菌液推荐用量，斜杠后面为50 mL 菌液推荐用量；没有斜杠的数据为通用的试剂用量。

1. 在**AEC Column A**中加入**5 mL Buffer BEQ**，使用重力流方式（下同）平衡离子交换柱，弃掉过柱收集液。平衡好的**AEC Column A**供**第7步**使用。注：此步骤也可以在菌液离心时进行操作。
2. 通过多次离心（**室温，6000 ×g，15 min**）在50 mL离心管中收集**25 mL / 50 mL**过夜培养的菌液；弃上清，将离心管倒扣在纸巾上除去残留的液体培养基。注：培养基残留可能会导致质粒得率下降。
3. 加入**2.5 mL / 5 mL Buffer A1**（确保已加入RNase A），使用移液器吹打或涡旋震荡，使细菌充分悬浮，无菌块。注：充分悬浮细菌对后续菌体裂解及裂解液的中和十分重要。
4. 加入**2.5 mL / 5 mL Buffer B1**（确保无沉淀析出或已通过加热方式溶解沉淀），温和反转**5-10次**，然后静置**5 min**至溶液粘稠而澄清。注：静置时间不超过5 min，时间过长会导致基因组DNA污染或质粒受损。
5. 加入**2.5 mL / 5 mL Buffer N3**，温和反转**5-10次**，至溶液充分混匀，此时出现白色絮状沉淀，充分混匀后**静置5 min**。注：裂解液须充分混合，如果混合物仍然呈现圆球状、褐色或者比较粘稠，则需继续混合以完全中和裂解液。

6. **室温，≥12,000 ×g**离心**10 min**，离心过后用20 mL的ezFilter Syringe轻轻推动进行过滤，用新的离心管收集上清。
7. 小心将过滤好的上清转移至**第1步预先平衡好的AEC Column A**中，弃掉过柱收集液。
8. 在**AEC Column A**中加入**5 mL / 8 mL Buffer BWH I**，弃掉过柱收集液。
9. 在**AEC Column A**中加入**5 mL / 8 mL Buffer BWH II**，弃掉过柱收集液。
10. 在**AEC Column A**中加入**10 mL Buffer BEL**，使用新的无内毒素的50 mL离心管（客户自备）**收集**过柱收集液。

后续纯化过程可以选择常规离心沉淀法或过柱法。离心沉淀法操作简单，但相对耗时，且需要有低温高速离心机的支持。过柱法相对省时，无需低温离心机，但操作环节稍多，且需要单独购买Express Column A（Cat: BW-BD10031，附送Plastic Wrench）。

可选方案一：离心沉淀法

11. 向**步骤9**的过柱收集液中加入**0.7倍**体积的**异丙醇**（比如10 mL过柱液体，加入7 mL异丙醇），颠倒混匀后**4℃，14,000 ×g**离心**30 min**；离心结束后小心吸弃上清。
12. 在离心管中加入**3 mL 70%乙醇**，轻轻摇晃几下；**室温，14,000 ×g**离心**5 min**；离心结束后小心吸弃上清。
13. 离心管敞口在空气中晾干**5-10 min**，加**0.3 mL Endofree Elution Buffer**，枪头轻轻吹打后涡旋震荡使其完全溶解。注：不可使



其过于干燥，否则将难以溶解，可根据后端浓度加入溶解体积，溶解体积最小为100 μ L。

14. 将质粒溶液转移到**2 mL Microfuge Tube**中保存备用。

可选方案二：过柱法

过柱方案需提前向倍沃医学单独购买 **Express Column A** (Cat: BW-BD10031, 附送 **Plastic Wrench**)。

15. 向**步骤9**的过柱收集液中加入**0.7倍**体积的**异丙醇**（比如10 mL 过柱液体，加入7 mL异丙醇），颠倒混匀后**4°C, 14,000 $\times$ g离心30 min**；离心结束后小心吸弃上清。

16. 混合液加入**Express Column A**，利用柱塞挤压过滤，弃废液。

17. 用**Plastic wrench**将膜柱从**Express Column A**拆下，将柱塞从**Express Column A**中拔出，重新组装**Express Column A**，加入**2 mL 70%乙醇**，利用柱塞将滤液排出，弃废液。

18. 用**Plastic wrench**将膜柱从**Express Column A**拆下，将其放入2.0 mL离心管中， **$\geq 12,000 \times g$ 离心1 min**，倾倒滤液。

19. 再次将膜柱放入2.0 mL离心管中， **$\geq 12,000 \times g$ 离心2 min**。

20. 将膜柱放入**新的**2.0 mL离心管中，空气中**晾干5-10 min**。

21. 在膜柱中加入**300 μ L Endofree Elution Buffer**，静置1min， **$\geq 12,000 \times g$ 离心1 min**；再向膜柱中加入**200 μ L Endofree Elution Buffer**，静置1 min， **$\geq 12,000 \times g$ 离心1 min**。注：可将洗脱下来的液体吸取400 μ L重新上柱、离心，这样可提升质粒收获量。

购买须知

根据说明书使用时，本产品保证性能符合产品标示和倍沃文献中的描述。倍沃不提供任何其他类型的明示或暗示保证，包括但不限于适销性或特定用途适用性等。倍沃对违反本保证的唯一义务和购买者的唯一补救措施是由倍沃选择更换产品。倍沃对因使用产品、使用产品结果或无法使用产品而引起的任何直接、间接、后果性或附带损害不承担任何责任。如需技术支持或了解更多产品信息，请致电 400-115-2855 与我们联系。

登录官方网站获取产品手册等更多信息：

<http://www.beiwobiomedical.com/>

