

## 质粒中提试剂盒简明说明书（BW-PD1411）

Ver: 1912

### 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。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。

本试剂盒适用于从 15-50 mL 大肠杆菌培养液中快速高效地提取质粒。50 mL 菌液的得率大约 200 µg。

纯化得到的质粒可用于下游应用, 例如克隆/亚克隆、RFLP、测序及转染 HEK293 等健壮细胞。

### 产品构成

| Catalog#           | -00   | -01    | -02    |
|--------------------|-------|--------|--------|
| Preps              | 2     | 10     | 25     |
| Midi Columns       | 2     | 10     | 25     |
| Collection Tubes   | 2     | 10     | 25     |
| 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 C1          | 7 mL  | 35 mL  | 85 mL  |
| DNA Wash Buffer*   | 3 mL  | 12 mL  | 30 mL  |
| Elution Buffer     | 5 mL  | 10 mL  | 15 mL  |
| RNase A (20 mg/mL) | 30 µL | 150 µL | 350 µL |
| User 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 12 mL (BW-PD1411-00)或 48 mL (BW-PD1411-01)或 120 mL (BW-PD1411-02) 96-100%乙醇加入至 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。
- 确保离心机转速可以达到 12,000 ×g。
- 室温下（15-25℃）进行所有离心操作。

### 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 的 Buffer A1 应储存于 4℃。

### 实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 15 mL 和 50 mL 离心管
- 高速离心机

### 操作步骤（离心法）

1. 接种新鲜的 50 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:** 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:** 请勿使用保存于 4℃的菌液。

**注:** 请勿从冻存的甘油菌直接培养。

**注:** 请勿使用超过 50 mL 的菌液或者细胞量大于 150。若超过 50 mL 菌液量, 对应 Buffer 的使用量应加大。

**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。

2. 柱平衡: 向吸附柱 **Midi Column** 中加入 **1mL Buffer GBL**, 10,000 xg 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. 5000 xg 离心 10 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。

**注:** 残留培养基将造成裂解不充分及低的产量。

4. 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。

**注:** 充分重悬有利于菌体裂解和中和。

5. 加入 **2.5 mL Buffer B1**, 轻轻地反转 10 次以混匀（不要涡旋）, 室温静置 5 min 直至溶液澄清。

**注:** 静置时间不要超过 5 min, 时间过长会导致基因组污染或质粒损伤。

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

6. 加入 **1 mL Buffer C1**, 立即反转 5-10 次混匀。

**注:** 冰上静置 1 min 有助于增加产量。

**注:** 混合均匀, 若混合物依旧呈团块、褐色、粘稠, 需要更多地混匀以完全中和。

7. 两种方案可供选择:

**高速离心:** 将裂解液转移至一个高速离心管, 12,000 ×g 离心 10-15 min。将澄清的裂解液转移至一个 15 mL 离心管（避免吸

到漂浮的沉淀)

**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。

**使用 Filter Syringe:** 将裂解液直接倒入 Filter Syringe, 将 Filter Syringe 插入一个干净的架在架子上的 15 mL 离心管 (未提供), 静置 10 min, 可看见白色沉淀漂浮至顶部。握住 Filter Syringe 和 15 mL 离心管, 轻轻推动助推器至底部, 当阻力太大时停止下压, 可能在 Filter Syringe 内留下部分裂解液, 不要强迫残留的裂解液通过 Filter Syringe。

8. 小心地转移上清至 15 mL 离心管 (避免吸到漂浮的沉淀), 加入 **2 mL Buffer C1** 和 **2.5 mL** 无水乙醇, 剧烈震荡以混匀, 将混合液转移至预处理 **Midi Column**。

9. 快速转移 5 mL 的上述混合液至一个预处理 **Midi Column**, 10,000 xg 离心 1 min, 弃滤液, 将柱子放回收集管。将剩余样品转移至柱子, 10,000 xg 离心 1 min, 弃滤液, 将柱子放回收集管。

**注:** **Midi Column** 最大可容纳 5 mL 液体, 若混合液有 5 mL, 请于室温静置 2-5 min (避免离心过程中液体撒出)。

10. 加入 **5 mL DNA Wash Buffer**, 10,000 xg 离心 1 min, 弃滤液。

11. 加入 **5 mL** 100%乙醇, 10,000 xg 离心 1 min, 弃滤液。

12. 将 **Midi Column** 开盖, 10,000 xg 离心 10 min。

**注:** 残留的乙醇可通过打开柱盖离心的方式去除, 乙醇是否去除干净至关重要。

13. 将 **Midi Column** 转移至一个干净的 15 mL **Collection Tube**, 在膜中央加入 **0.3-0.5 mL Elution Buffer** (55°C 预热) 或无菌 ddH<sub>2</sub>O, 室温静置 1 min, 10,000 xg 离心 5 min 洗脱质粒 DNA。

**可选:** 将洗脱下来的液体二次上柱洗脱。

**注:** 第一次洗脱可得到约 70%质粒 DNA, 将洗脱下来的 DNA 二次上柱可得到另外 20-30%的 DNA。

**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:** 若用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射, 强烈建议使用去除内毒素试剂盒 (**PD1415**)。

14. DNA 浓度可通过以下方式计算,

$$\text{DNA 浓度 (}\mu\text{g/mL)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{稀释倍数}$$

### 低拷贝数质粒和柯斯质粒的纯化

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  $\mu\text{g/mL}$ , 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。最多使用 100 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, C1, 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 和 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°C. 请勿将菌液置于 4°C 过夜。 |
|         | 质粒拷贝数低                 | 增加培养基和 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 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.beiwobiomedical.com)

400-115-2855

[sales@beiwobiomedical.com](mailto:sales@beiwobiomedical.com)

