

质粒中提过滤法试剂盒 I 简明说明书 (PD1413)

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。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。

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, 提供的 Midi Column 可结合至多 250 µg 质粒 DNA。50 mL 菌液的得率大约 150-250 µg。

纯化得到的质粒可用于下游应用, 例如转染 HEK293 等健壮细胞、基因定位、文库筛选、测序以及基因治疗和基因疫苗。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Midi Columns	2	10	25
Filter syringe (20 mL)	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*	5 mL	24 mL	54 mL
RNase A (20 mg/mL)	30 µL	150 µL	350 µL
Elution Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
User Manual	1	1	1

要点

- **RNase A:** 室温下 (15-25°C) 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°C 保存。
- **DNA Wash Buffer:** 使用前请将 20 mL (PD1413-00) 或 96 mL (PD1413-01) 或 216 mL (PD1413-02) 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°C 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 C1** 在低于 10°C 时可能形成沉淀, 使用前请于 37°C 温浴溶解。
- 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°C) 进行所有离心操作。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自购买之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。加入 RNase A 的 Buffer A1 应储存于 4°C。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 高速离心机
- 30 mL 高速离心管
- 15 mL 和 50 mL 锥形管
- 1.5 mL 离心管
- 异丙醇 (用以沉淀质粒 DNA)

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°C 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°C, 震荡 (约 250 rpm) 培养 8 h。

注: 请勿使用超过 50 mL 的菌液或者细胞量大于 150。若超过 100 mL 菌液量, 对应 Buffer 的使用量应加大。

注: 请勿使用保存于 4°C 的菌液。

注: 请勿从冻存的甘油菌直接培养。

2. 5,000 x g 离心菌液 10 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。

3. 柱平衡: 向吸附柱 **Midi Column** 中加入 **1 mL Buffer GBL**, 10,000 x 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)。

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 5 次以混匀, 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。

6. 加入 **3 mL Buffer C1**, 立即反转 5 次, 手动震荡 3 次以混匀。

注: 冰上静置 1 min 有助于减少步骤 6 的蛋白漂浮。

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. **可选 1:** 将裂解液转移至高速离心管内, 14,000 x g 离心 10 min, 小心转移上清液至一个 15 mL 离心管 (避免吸到漂浮的沉淀)。

注：若离心机转子是冷的，室温放置 10 min，按说明书描述进行离心。

可选 2：将 **Filter syringe** 插入至置于架子上的一个干净的 15 mL 离心管(自备)，将裂解液直接倒入 **Filter syringe**，静置 10 min。可看到白色沉淀物漂浮在上方。将 **Filter syringe** 固定在 15 mL 管上方，轻轻推动柱塞，将裂解液排出，当阻力过大可停止，不要强迫裂解液通过 **Filter syringe**，可能会有些裂解液仍留在絮状沉淀中。

8. 加入 3 mL 无水乙醇，手动剧烈震荡，快速混匀。立即将混合液加入至 **Midi Column**，离心。

9. 小心地转移 6 mL 混合液至 **Midi Column**（带有 **15 mL Collection Tube**），>2,500 x g 离心 1 min，弃滤液，将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**。重复步骤 **9**，直至所有裂解液通过。

10. 加入 **5 mL DNA Wash Buffer**，> 2,500 x g 离心 1 min，弃滤液，将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**。重复步骤 **10**。

11. 将 **Midi Column** 开盖，> 5,000 x g 离心 10 min 去除残留的乙醇。65℃烘干 10 min 将有利于去除残留乙醇并增加洗脱效率。

注：残留的乙醇可通过打开柱盖离心的方式去除，乙醇是否去除干净将会影响最后的洗脱效率。

12. 将 **Midi Column** 转移至一个干净的 15 mL 离心管，在膜中央加入 **0.3-0.5 mL Elution Buffer** 或 ddH₂O，室温静置 1 min，> 5,000 x g 离心 5 min 洗脱质粒 DNA。

13. 为了获得更高产量的质粒 DNA，将第一次洗脱下来的液体重新上柱，静置 1 min，> 5,000 x g 离心 5 min。

注：若使用 ddH₂O 进行洗脱，确保 pH 在 7.0-8.5，若 pH 低于 7，会导致低的洗脱效率。

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。若用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射，强烈建议去除内毒素（PD1415）。

注：第一次洗脱大约可得到 60-80% 的 DNA。二次洗脱可增加 DNA 回收率至 90%。为了获得最大得率和更高浓度，将洗脱下来的液体收集，加入 0.1 倍体积的 3 M KAc 或者 NaAc（pH5.2）和 0.7 倍体积的异丙醇。混合均匀，最大转速离心 10 min，弃上清，用 800 μL 70%乙醇洗涤 DNA，离心 5 min，弃上清。干燥 5-10 min。用 **Elution Buffer** 或无菌 ddH₂O 重悬 DNA。

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 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。不要超过 100 mL。
- 使用 2 倍体积的 **Buffer A1**，**B1**，**C1**，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** 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℃。请勿将菌液置于 4℃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

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com

