

快速法质粒大提试剂盒简明说明书 (PD1568)

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, Maxi 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 100-200 mL 大肠杆菌培养液中快速高效地提取质粒, 提供的 Maxi Column 可结合至多 1000 µg 质粒 DNA。

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
Maxi Columns	2	10	25
Filter Syringe (60 mL)	2	10	25
2 mL Microfuge Tubes	4	20	50
Plastic wrench	1	1	1
Buffer GBL	6 mL	30 mL	75 mL
Buffer A1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer B1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer C1	27 mL	135 mL	2 x 170 mL
DNA Wash Buffer*	15 mL	54 mL	2 x 54 mL
RNase A (20 mg/mL)	110 µL	550 µL	1.35 mL
Elution Buffer	6 mL	30 mL	75 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 Buffer A1/RNase A 置于 4°C 保存。
- DNA Wash Buffer: 使用前请将 60 mL (PD1568-00) 或 216 mL (PD1568-01) 或 216 mL (PD1568-02) 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°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。
- 确保离心机转速可以达到 12,000 rpm, 特别是当裂解液与乙醇混合后, 需要立即离心处理。
- 将裂解液加入至 Maxi Column 时, 请确保 Maxi Column 拧紧 (使用 Plastic wrench)
- 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°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
- 50 mL 高速离心管

- 异丙醇 (用以沉淀质粒 DNA)

操作步骤 (离心法)

1. 接种新鲜的 100 µL 菌液到 **100-200 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 6-8 h。

注: 请勿使用超过 200 mL 的菌液。若超过 200 mL 菌液量, 对应 Buffer 的使用量应加大。

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

注: 残留培养基的完全去除对于下一步的菌体裂解非常重要。

3. 柱平衡: 向吸附柱 **Maxi Column** 中加入 **2.5 mL Buffer GBL**, 使用柱塞将滤液排出柱子, 吸附柱处于备用状态 (处理完请于当天使用)。

4. 加入 **10 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: 充分重悬有利于最佳产量的获得。

5. 加入 **10 mL Buffer B1**, 轻轻地反转 10 次以混匀, 室温静置 5-10 min 直至溶液澄清。完全裂解对于 DNA 得率非常重要。完全裂解的细菌混合液看起来是透明的。

注: Buffer B1 低于室温会形成沉淀, 使用前请于 37°C 温浴溶解。

6. 加入 **12 mL Buffer C1**, 立即反转 10 次, 震荡 5 次以混匀。混合均匀非常必要, 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。**注:** 若菌液的 RNA 量较多, 可静置 10 min 使 RNA 酶充分发挥作用。

7. 过滤裂解物有两个选择:

高速离心: 转移裂解液至一个高速离心管, 12,000 rpm 离心 15 min. 转移澄清的裂解液至 50 mL 离心管。

Filter Syringe: 将 **Filter Syringe** 插入至置于架子上的一个干净的 50 mL 离心管 (没有提供), 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. 轻轻推动柱塞, 将裂解液排出, 当阻力过大可停止, 可能会有些裂解液仍留在絮状沉淀中。

注: 为了避免 **Filter Syringe** 堵塞, 过夜培养的菌液量要少于 200 mL, 加入 **Buffer C1** 后要混匀. 可选择性将裂解液转移至另一个 **Filter Syringe** (可单独向 **Biomiga** 购买)。

8. 加入 12 mL 无水乙醇 (96-100%), 剧烈震荡 5 次以混匀。

9. 将混合物转移至 **Maxi Column** (置于一个 50 mL 离心管内), 使用柱塞将滤液排出柱子。

注: 加入裂解液至 **Maxi Column** 时, 请确保 **Maxi Column** 拧紧 (使用 **Plastic wrench**)。

10. 用 **Plastic wrench** 将膜柱从 **Maxi Column** 拆下, 将柱塞从 **Maxi Column** 取出, 用相同的膜柱组装 **Maxi Column**, 加入剩余的混合液. 用柱塞将滤液排出, 直至所有混合液通过 **Maxi Column**。

注: 请确保从 **Maxi Column** 上拆下膜柱, 然后取出柱塞, 否则柱内外的压力差会使膜破裂。

11. 加入 **10 mL DNA Wash Buffer**, 至组装好的 **Maxi Column** (取出柱塞前从 **Maxi Column** 拆下膜柱), 用柱塞将滤液排出. 重复步骤 **11**。

12. 使用 **Plastic wrench** 将末端组件从 **Maxi Column** 分离, 插入

至 **2 mL Microfuge Tube**。

13. 12,000 rpm 离心 1 min. 弃滤液, 将 **Maxi Column** 放回 **2 mL Microfuge Tube**, 最大转速离心 2 min, 室温干燥 3-10 min。

14. 将 **Maxi Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管或 **2 mL Microfuge Tube**, 在膜中央加入 **500 µL Elution Buffer** (60°C 预热将增加得率), 室温静置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min 洗脱质粒 DNA. 再在膜中央加入 **300 µL Elution Buffer**, 室温静置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min。

15. 重复步骤 **13**。

16. **可选:** 将洗脱下来的液体重新上柱, 第一次洗脱可得到约 60-70% 质粒, 二次洗脱可得到剩余 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或 **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, 强烈建议去除内毒素. 请使用 **Biomiga** 的无内毒素质粒大提试剂盒 (**PD1520** 或 **PD1522**)。

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 A1, B1, C1 和 100% 乙醇的体积 (1:1:1.2:1.2)。
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

