

BW-PD1513 高纯度质粒大量提取试剂盒（沉淀法）

目录

试剂盒组成	2
产品说明	2
储存条件及产品稳定性	2
使用前注意事项	2
重要说明	3
重要提示	3
实验前需自行准备的材料与试剂	4
安全事项	4
操作步骤	5
纯化低拷贝质粒/科斯质粒	7
纯化 > 12Kb 的质粒	7
问题指南	8
Related Products	9
购买须知	10

试剂盒组成

Catloga#	BW-PD1513-00	BW-PD1513-01	BW-PD1513-02
Preps	2	10	25
Buffer A1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer B1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer C1	27 mL	135 mL	330 mL
Buffer KB	22 mL	110 mL	270 mL
RNase A (20 mg/mL)	2.2 mg (110 µL)	11 mg (550 µL)	27 mg (1.35 µL)
Elution Buffer	6 mL	30 mL	60 mL
User menu	1	1	1

产品说明

本试剂盒采用独特的缓冲液系统，将碱裂解法和异丙醇沉淀法结合起来，从大量的培养菌中提取高纯度的质粒 DNA，可直接用于各种常规实验操作，如酶切、PCR、测序、连接、转化实验。如果需要更高纯度的质粒 DNA，建议使用 PD1516 试剂盒

该试剂盒可以用来从 100 mL 以上的大肠杆菌菌液中快速，高效地提取质粒 DNA。方法简单，无需过柱，不用酚氯仿抽提；质粒损失率少，质粒损伤小，质粒提取量在 1 mg 以上，最高可以达到 10 mg。菌液使用量灵活，高拷贝质粒可使用 100 mL 菌液，中低拷贝质粒可使用更多的菌液。纯化过程约需 1 小时。

储存条件及产品稳定性

Buffer A1 在加入 RNase A 后，需放在 4℃ 保存。其他所有试剂成分可置于常温下保存（4-28℃），本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。

使用前注意事项

仔细查阅本操作指南，确保所有的试剂成分以及其他材料都已经准备好，并熟悉操作。请特别注意以下几点：

重要说明

- RNaseA: 20 mg/mL，可以在室温下保存半年。使用前，请将 RNase A 管瞬间离心。使用前，请将 RNaseA 加入到 Buffer A1 中。
- **Buffer B1 在低于正常室温下会形成沉淀，在使用前请将 Buffer B1 置于 50°C 加热溶解（这一步十分重要）。**
- Buffer B1 使用后请旋紧瓶盖。
- 所有的离心操作在室温下进行。

重要提示

质粒拷贝数：质粒 DNA 的产品决定于质粒 DNA 大小和拷贝数。针对高拷贝的质粒，本试剂盒的操作流程进行了优化。如果是低拷贝的质粒，则菌液体积和所用的溶液都需要加倍。如需要进一步了解我们的产品信息，请联系我们的客户服务，表 1 列出了常用的质粒的相关特性。

表 1 常用的质粒及其预期产量

质粒	来源	拷贝数	预期产量 (µg 每 1 mL)
pSC101	pSC101	5	0.1-0.2
pACYC	P15A	10-12	0.4-0.6
pSuperCos	pMB1	10-20	0.4-1
pBR322	pMB1	15-20	0.6-1
pGEM ^R	Muted pMB1	300-400	6-7
pBluescript [®]	ColE1	300-500	6-8
pUC	Muted pMB1	500-700	8-12

宿主菌：菌株对质粒的扩增繁殖有着显著的影响，TOP10 和 DH5a 宿主菌能产生高拷贝质粒 DNA，而诸如 JM101， JM110， HB101， TG1 及其衍生株系等 *endA*⁺ 菌株，质粒 DNA 产率一般比较低，这是由于在裂解的时候，*endA*⁺ 株系会释放内源的核酸内切酶和以及很多糖类物质。因此当质粒产量不符合要求时，我们建议将质粒转进 *endA*⁻ 菌株。表 2 列出了一些 *endA* 株系的分类。

表 2 大肠杆菌的 *endA* 株系分类

<i>EndA</i> ⁻ Strains of <i>E. Coli</i>							
DH5α	DH1	DH21	JM106	JM109	SK2267	SRB	XLO

BW-PD1513 高纯度质粒大量提取试剂盒（沉淀法）

TOP10	DH10B	JM103	JM107	SK1590	MM294	Stbl2™	XL1-Blue
BJ5182	DH20	JM105	JM108	SK1592	Select96™	Stbl4™	XL10-Gold
EndA+ Strains of <i>E. Coli</i>							
C600	JM110	RR1	ABLE® C	CJ236	KW251	P2392	BL21(DE3)
HB101	TG1	TB1	ABLE® K	DH12S™	LE392	PR700	BL21(DE3) pLysS
JM101	JM83	TKB1	HMS174	ES1301	M1061	Q358	BMH 71-18
所有的 NM 株系				所有的 Y 株系			

生物量优化（Cell Mass）(OD₆₀₀ × 菌液 mL 数)：本操作流程的最佳条件为：在 LB 培养基中培养了 12-16 个小时后，OD₆₀₀ 值在 2.0 至 3.0 的菌液中的质粒。如果使用富集培养基比如 TB 培养基和 2×YT 培养基，则菌液的 OD₆₀₀ 值不能超过 3.0。如果细胞数目过多，可以适当降低生物量或者按比例提高 A1, B1 和 C1 的用量。

菌液体积：培养菌液的培养液的体积应不大于摇菌瓶或者摇菌管总体积的 1/5，不要超过操作手册中建议的最大的菌液量。由于菌液体积过多造成的裂解不充分会降低纯度和产量。

实验前需自行准备的材料与试剂

- 70%酒精
- 高速离心机
- 50 mL 圆锥形管
- 异丙醇
- 3M NaAC (pH=5.2) 或者 3M KAC (pH=5.2)

安全事项

- Buffer C1 含有酸性物质，操作时请带手套和眼罩；
- Buffer C1 和 Buffer KB 含有离液盐，当与漂白剂结合时，会发生反应。
不要将漂白剂或者酸性溶液直接加到预备的废液桶中。

操作步骤

注：本试剂盒中提供的溶液量及操作步骤是根据 OD₆₀₀ 在 2.0-3.0 的高拷贝质粒的 200 mL 菌液提供，如需更多溶液，请联系倍沃公司。当使用的菌液量大于 200 mL，相应溶液的使用量请参考下表：

Culture Volume	< 200 mL	300 mL	400 mL	500 mL	Ratio
Buffer A1/RNase	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	1 V
Buffer B1	9 mL	13.5 mL	18 mL	22.5 mL	0.9 V
Buffer C1	3 mL	4.5 mL	6 mL	7.5 mL	0.3 V
Buffer KB	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	10 mL
70% ethanol	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	20 mL

1. 将初摇的 100 μ L 加入到 **100 -200 mL** 的 LB 培养基（含适量抗生素），37°C 震荡培养 14-16 小时。

注：建议大肠杆菌的培养时间不要超过 16 个小时，因为超过 16 个小时后，大肠杆菌的开始降解，这样可能会降低质粒产量。

注：不要直接从甘油保存的菌种中取菌液培养。

注：本说明书中的操作程序适用于标准 LB（Luria Bertani）培养基培养 12-16 小时后，OD₆₀₀（细菌密度）在 2.0-3.0 之间的菌液。若采用的是富集培养基，例如 TB 或 2×YT，

请注意保证 OD₆₀₀ 不超过 3.0。如果使用过量的菌液，须相应地提高 Buffer A1，B1 和 C1 的用量。

2. 室温下 5,000 x g 离心 10 min，收集菌体，将上清倒掉，并将收集管倒扣在纸巾上以除去残留在菌体表面的培养基，将上清完全去除。

注：残留的液体培养基将会导致

- 菌液裂解不充分，质粒 DNA 产量下降
- 第 6 步离心后沉淀较松，不能有效吸取上清。

3. 加入 **10 mL Buffer A1**（确保已加入 RNase A），用移液枪或涡流震荡充分悬浮细菌细胞。

注：细菌细胞的充分悬浮均匀对后续的菌体裂解和裂解液中和十分重要。

4. 加入 **10 mL Buffer B1**，温和地反转 5-10 次以混合均匀，然后静置 2-5 min 至溶液粘稠而澄清，如果有必要，持续混匀。

BW-PD1513 高纯度质粒大量提取试剂盒（沉淀法）

注：静置时间不超过5 min，时间过长会导致基因组DNA污染或质粒受到损伤。

注：Buffer B1在低于室温下会形成云状的沉淀，使用前请在Buffer B1 置于50°C 加热溶解。

5. 加入 **3 mL Buffer C1**，立即反转多次，至溶液充分混匀，此时出现白色絮状沉淀。

注：将裂解液在置于冰上1 min 有助于提高质粒产量。

注：若菌液的RNA量较多，可静置10 min使RNA酶充分发挥作用。

注：裂解液必须充分混合，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. 将离心管转至高速离心机，在**室温下**12,000 x g 离心10 min。

注：若上清中仍然有白色沉淀，可以将上清吸取置于一新的离心管中，离心5 min。

注：如果转子是冷的，将裂解液在室温下放置10 min，然后在按照上述步骤离心。

7. 小心吸取离心后的上清液至 50 mL 离心管中（避免吸起沉淀），加入**0.1倍**体积的**3M NaAC** 或者 **3M KAC**和**0.7-1倍**体积的**异丙醇**，用手迅速颠倒混匀。

8. **4°C** 10,000~12,000 x g 离心 **20 min**，这时候将出现质粒DNA沉淀，小心倒去上清，沉淀上残留的上清用枪头吸干。

注：数百微克高纯度的质粒DNA离心后沉淀在管的侧壁上，可能无法看到明显团块。

9. 加入**5 mL Buffer KB**，将沉淀轻轻弹起，室温放置约**5 min**，**4°C** 10,000~12,000 x g 离心 **5 min**，沉淀上残留的上清用枪头吸干。

注：这时候白色的沉淀将变得透明或者半透明，倾倒沉淀要小心，不要将沉淀倒出。

10. 加入**5 mL 70% 乙醇**，将沉淀轻轻弹起，室温放置约**5 min**，**4°C** 10,000~12,000 x g 离心 **5 min**，将上清小心倒出，沉淀上残留的上清用枪头吸干，重复步骤10。

注：这时候透明的沉淀将重新变成白色的沉淀。

11. 5,000 x g 离心 **1 min**，用枪头将残留的酒精吸干。

12. 将离心管在空气中风干，或者置于55°C烘箱中**5 min**，以彻底去除残留酒

BW-PD1513 高纯度质粒大量提取试剂盒（沉淀法）

精。

注：不要过分干燥，否则质粒DNA沉淀不容易溶解。

13. 加入 **1-1.5 mL Elution Buffer** 或者 **ddH₂O**，可置于65℃水浴中溶解或用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解。

注：提取到的质粒DNA可直接用于基因克隆、测序、酶切、文库筛选、体外转录翻译、转染HEK293细胞。若用于转染内毒素敏感性细胞株，原代细胞及用于微注射，建议去除内毒素（PD1516）。

14. DNA浓度计算如下：

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

注：纯化的质粒的OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值在1.7-1.9之间，如果用水溶解，OD₂₆₀/OD₂₈₀会偏低，但并不表示DNA纯度低，因为PH值和离子存在会影响OD比值。

纯化低拷贝质粒/科斯质粒

从过夜的培养物中得到低拷贝质粒浓度一般为 0.1-1 μg/mL，如果要纯化低拷贝和中等拷贝的质粒,请参照下面的指南操作：

- 1 菌液体积：使用**2倍体积的菌液**，使用的菌液体积为高拷贝质粒的菌液体积的2倍。
- 2 使用**2倍体积的 Buffer A1, B1, C1**，如需额外的A1, B1, C1，可向倍沃购买。

纯化 > 12Kb 的质粒

如果纯化的质粒大于 12 Kb,请参照下面的指南操作：

- 1 菌液体积：使用**2倍**的菌液体积，使用的菌液体积为高拷贝质粒的菌液体积的2倍。
- 2 使用**2倍体积的 Buffer A1, B1, C1**，如需额外的A1, B1, C1，可向倍沃购买。
- 3 **Elution Buffer** 加入前在 65-70℃中预热。

问题指南

问题	可能的原因	建议
产量低	细胞裂解不充分	- 加入B1 前，用枪头或者涡旋振荡器充分悬浮细胞团。 - Buffer B1 如果没盖紧会降低裂菌的效果。按照 0.2 M NaOH, 1% SDS 准备新鲜的 Buffer B1。
产量低	菌液生长过度或者菌液不新鲜	- 菌液培养不要超过16小时。 - 如果暂时不做，不要将菌液放4°C保存，将菌液离心去上清后放-20°C保存。
产量低	质粒拷贝数低.	按照第8页的建议增加菌液用量和 A1, B1和C1的用量。
没有DNA	质粒在大肠杆菌宿主菌中丢失	使用新鲜的菌液。
基因组DNA污染	加入B1后放置时间过长或者动作过于剧烈	加入B1后不要涡旋或者剧烈摇晃。加入B1后放置时间不要超过5 min。
RNA污染	RNase A 没有加入到 Buffer A1	将 RNase A 添加到 Buffer A1 中。

Related Products

Catalog #	Product Name	Preps	Price RMB
PD1211-01	Plasmid mini kit	50	315.00
PD1211-02	Plasmid mini kit	250	1340.00
PD1213-01	Plasmid mini kit II	50	420.00
PD1213-02	Plasmid mini kit II	250	1785.00
PD1411-01	Plasmid midi kit	10	364.00
PD1411-02	Plasmid midi kit	25	800.00
PD1413-01	Plasmid ezFilter midi kit	10	434.00
PD1413-02	Plasmid ezFilter midi kit	25	922.00
PD1511-01	Plasmid maxi kit	10	840.00
PD1511-02	Plasmid maxi kit	25	1850.00
PD1512-01	Plasmid ezFilter maxi kit	10	910.00
PD1512-02	Plasmid ezFilter maxi kit	25	2000.00
PD1611-01	Plasmid ezFilter mega 3 kit	2	560.00
PD1611-02	Plasmid ezFilter mega 3 kit	10	2380.00
PD1612-01	Plasmid ezFilter mega 6 kit	2	700.00
PD1612-02	Plasmid ezFilter mega 6 kit	10	2980.00
PD1614-01	Plasmid ezFilter mega 10 kit	2	980.00
PD1614-02	Plasmid ezFilter mega 10 kit	10	4170.00

购买须知

根据说明书使用时，本产品应按其标签和倍沃的文献中所述执行。倍沃不提供任何其他类型的明示或暗示，包括但不限于适销性或适合某一特定目的的保证。在选择倍沃时，违反本保证的，倍沃唯一的义务和买方的唯一补救措施是更换产品，倍沃应当没有任何直接或间接的，或使用引起的附带损害，或无法使用它产品的责任。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA（中国）

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com

