

无内毒素质粒小提试剂盒简明说明书（BW-PD1220）

Ver: 2003

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统,Mini 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 EndoFreeElution Buffer 洗脱。

传统方法分离的质粒通常含有高水平的内毒素（脂多糖），对于内毒素敏感细胞系转染或显微注射，应先清除内毒素。该系统使用一种特殊配方的缓冲液，可从质粒 DNA 中提取内毒素。质粒 DNA 中内毒素含量低于 10 EU/μg。

本试剂盒适用于从 1-5 mL 大肠杆菌培养液中提取质粒，提供的 Mini Column 可结合至多 50 μg 质粒 DNA。纯化得到的无内毒素质粒可用于下游应用，例如内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射。

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 后的 Buffer A1 应储存于 4℃。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 1.5 mL 和 2.0 mL 离心管
- 小型台式离心机或真空负压装置

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	10	50	250
Mini Columns	10	50	250
2 mL Collection Tubes	10	50	250
Buffer GBL	8 mL	30 mL	150 mL
Buffer A1	3 mL	15 mL	70 mL
Buffer B1	3 mL	15 mL	70 mL
Buffer N3	1 mL	5 mL	24 mL
Buffer KB	6 mL	30 mL	135 mL
Buffer RET	3 mL	15 mL	70 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	12 mL	54 mL
EndoFree Elution Buffer	2 mL	10 mL	30 mL
RNase A (20 mg/mL)	15 μL	75 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-PD1220-00)或 48 mL (BW-PD1220-01)或 216 mL (BW-PD1220-02) 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℃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 N3 保存时可能会形成沉淀，加热至 37℃可溶解。
- 确保离心机转速可以达到 12,000 ×g。

- 在室温下（15-25℃）进行所有离心操作。

操作步骤（离心法）

1. 接种新鲜的单个菌落到 **1-5 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：请勿从冻存的甘油菌直接培养。

注：请勿使用保存于 4℃的菌液。

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. 12,000 ×g 离心 1 min，弃上清，将管子倒置于纸巾上，去除残留培养基。

注：残留的培养基将会导致裂解不充分而造成低 DNA 得率。

3. 柱平衡：向吸附柱 **Mini Column** 中加入 **500 μL Buffer GBL**，12,000 ×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 **250 μL 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：充分重悬对于细菌裂解和裂解液中和是至关重要的。

5. 加入 **250 μL Buffer B1**，轻轻地反转 10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 5 min。

注：静置时间不要超过 5 min。

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 **75μL Buffer N3**，立即反转/震荡 5-10 次以混匀。

注：冰上孵育 1 min 有助于增加产量。

注：若混合物仍然呈团块、褐色、粘稠状，一定要混合均匀，需要更充分混匀来完全中和。

7. 小心将裂解液转移至离心管，12,000×g 离心 10 min。转移上清液至 1.5 mL 离心管（避免吸到沉淀）。

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。

8. 加入 **250 μL Buffer RET** 和 **250 μL** 的 100%乙醇，手动震荡以混匀。并将混合液立即上柱。

9. 转移 700 μL 的上述混合液至一个 **Mini Column**（自带 **2 mL Collection Tube**），12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。再将剩余的上述混合液转移至 **Mini Column**，12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

10. **可选：**加入 **500 μL Buffer KB** 至 **Mini Column**，12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

注：此步骤对于 endA-菌株例如 DH5α和 TOP10 而言不是必要的，**Buffer KB** 对于 endA+菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的。

11. 加入 **500 μL DNA Wash Buffer**（使用前按要求加入乙醇），12,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**。

12. **可选：**重复步骤 **11**。

13. 将 **Mini Column** 放回 **2 mL Collection Tube**，打开柱盖，12,000 ×g 离心 2 min。

注：开盖离心可去除残留乙醇，该步骤至关重要。

14. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管，在膜中央加入 **50-100 μL (>50 μL)** 无菌水或 **EndoFreeElution Buffer**

（65℃预热），静置 1 min，12,000×g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

可选：将洗脱下来的液体重新上柱，二次洗脱。

注：第一次洗脱可得到约 70%的质粒 DNA，二次洗脱可回收到剩余 20-30%的质粒。

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：质粒 DNA 可用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染或显微注射。

15. DNA 浓度的确定，

DNA 浓度（μg/mL）=OD_{260nm}×50×稀释倍数

操作步骤（负压/离心法）

1. 根据制造商指南安装负压设备，将 **Mini Column** 连接到负压装置上。

2. 按照离心步骤 **1-7** 进行操作。小心转移上清液至 **Mini Column** 中，打开负压装置，允许裂解液通过柱子。重复此步骤直至剩余的溶液全部通过。

3. **可选：**加入 **500 μL Buffer KB** 至 **Mini Column**，打开负压装置，允许液体通过柱子。

注：此步骤对于 endA-菌株例如 DH5α和 TOP10 而言不是必要的，**Buffer KB** 对于 endA+菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的。

4. 加入 **500 μL DNA Wash Buffer**，打开负压装置，允许液体通过柱子。关闭负压装置。

可选：重复步骤 **5**。

5. 打开负压装置，空抽 5 min 以干燥柱子，去除乙醇残留。

6. 将 **Mini Column** 转移至一个干净的 1.5 mL 离心管，在膜中央加入 **50-100 μL (>50 μL)** **EndoFreeElution Buffer** 或无菌水，

静置 1 min，12,000 ×g 离心 1 min 洗脱质粒 DNA。

可选：将洗脱下来的液体重新上柱，二次洗脱。

低拷贝质粒/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。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, N3 和 RET，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，EndoFreeElution 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	增加培养基和对应 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 后超过 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	Buffer A1 中未加 RNase A	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



倍沃医学