

质粒小提试剂盒简明说明书（BW-PD1211）

Ver: 2405

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 Elution Buffer 洗脱。

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。1 mL 菌液的得率大约 8~12 µg。纯化得到的质粒可用于下游应用,例如基因克隆/亚克隆、RFLP、测序和转染细胞如 HEK293 细胞等。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02	-03
Preps	10	50	100	250
Mini Columns	10	50	100	250
2 mL Collection Tubes	10	50	100	250
Buffer GBL	8 mL	30 mL	60 mL	150 mL
Buffer A1	3 mL	15 mL	28 mL	70 mL
Buffer B1	3 mL	15 mL	28 mL	70 mL
Buffer N1	4 mL	20 mL	40 mL	100 mL
Buffer KB	6 mL	30 mL	55 mL	135 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	12 mL	22 mL	54 mL
Elution Buffer	2 mL	10 mL	30 mL	30 mL
RNase A (20 mg/mL)	15 µL	75 µL	140 µL	350 µL
User Manual	1	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-PD1211-00)或 48 mL (BW-PD1211-01) 或 88 mL (BW-PD1211-02) 或 216 mL (BW-PD1211-03) 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 rpm, 在室温下（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。Buffer A1 加入 RNase A 后 4℃保存, 其余所有试剂及用品可保存于室温（15-25℃）。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 1.5 mL 离心管
- 小型台式离心机

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: 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 **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）。

3. 12,000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。

注: 残留的液体培养基容易导致菌体裂解不完全, 从而降低产量。

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: 充分重悬有利于菌体裂解和中和。

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, 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 **350 µL Buffer N1**, 立即反转/振荡 5-10 次以混匀。

注: 冰上静置 1 min 有助于提高得率。

7. 12,000 rpm 离心 10 min。

注: 若裂解液不澄清, 将管子转一个角度, 再离心 5 min, 将澄清的裂解液转移至 **Mini Column**。

8. 小心将上清液转移至预处理 **Mini Column**（自带 **2 mL Collection Tube**）中, 避免吸到沉淀, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

9. 加入 **500 μL Buffer KB**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将 **Mini Column** 放回至 **2 mL Collection Tube**。

注: 此步骤对于 *end A*+菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的, 而对于 *end A*-菌株例如 DH5α和 TOP10 是不必要的。

10. 加入 **500 μL DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

可选: 重复步骤 10。

11. 将 **Mini Column** 开盖放回至 **2 mL Collection Tube**, 12,000 rpm 离心 2 min。

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

12. 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) Elution Buffer** 或 ddH₂O, 静置 1 min, 12,000 rpm 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: 第一次洗脱通常得到 70%左右的质粒。二次洗脱有利于回收剩下 20~30%的质粒 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、RFLP、文库筛选、体外翻译、测序等。

注: 若用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染及显微注射, 建议购买 PD1212。

13. DNA 浓度可通过以下方式计算,

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 **1-6** 进行操作。

3. 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。

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

注: 此步骤对于 *end A*+菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的, 而对于 *end A*-菌株例如 DH5α和 TOP10 是不必要的。

5. 加入 **500 μL DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇), 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。

6. 打开负压装置, 干燥空柱子 5 min。

7. 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) Elution Buffer** 或 ddH₂O, 静置 1 min, 12,000 rpm 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: 推荐使用 **Elution Buffer** 而不是 ddH₂O, 可使质粒 DNA 更稳定。若使用 ddH₂O, pH 应不低于 7.0 (7.0-8.5)。NaOH 可用于调节 ddH₂O 的 pH。若需长期保存 DNA, 则请用 **Elution Buffer**。

注: 纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如基因克隆、RFLP、文库筛选、体外翻译、测序等。

低拷贝数质粒的纯化

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, N1, 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、Buffer KB 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 A1,B1,N1 的体积。
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	RNase A 没有加入至 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

