

高纯度无内毒素质粒大量提取试剂盒（沉淀法） (BW-PD1516)

目录

产品说明	2
产品贮存及稳定性	2
试剂盒成分	2
使用前注意事项	2
推荐试剂用量	3
操作步骤	3
问题指南	5
购买须知	6

产品说明

本试剂盒（Cat. No. **PD1516**）适用于从 100 -200 mL 菌液中快速、高效地提取质粒 DNA 用于酶切、测序、转化等下游应用。

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 后的 Buffer A1 后应储存于 4°C。

试剂盒成分

Catalog#	BW-PD1516-00	BW-PD1516-01	BW-PD1516-02
Preps	2	10	25
Buffer A1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer B1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer N3	27 mL	135 mL	330 mL
EndoClean Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
Buffer KB	22 mL	110 mL	270 mL
RNase A (20 mg/mL)	110 µL	550 µL	1.35 mL
Endofree Elution Buffer	6 mL	30 mL	60 mL
User Manual	1	1	1

使用前注意事项

- 在 Buffer A1 中加入 RNase A 并混合均匀，混合后 4°C 保存。
- 若 Buffer B1 产生沉淀，37°C 水浴 10 分钟使沉淀充分溶解。
- 【客户自备】70%酒精、异丙醇、3M NaAC (pH 5.2) 或者 3M KAC (pH 5.2)。
- 【客户自备】无内毒素、无热源的 50 mL 离心管及其他耗材。
- 推荐：LB 培养基，培养 12-16 小时，OD600 在 2.0~3.0 之间。

推荐试剂用量

菌液体积	< 200 mL	300 mL	400 mL	500 mL	Ratio
Buffer A1 + RNase A	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 N3	3 mL	4.5 mL	6 mL	7.5 mL	0.3 V
EndoClean Buffer	上清体积的 0.1 倍				
Buffer KB	5 mL				
Endofree Elution Buffer	1-1.5 mL				

操作步骤

1. 在离心管中分两次共收集**100 mL**过夜培养的菌液，**室温，6,000 ×g**离心**15min**；弃上清，将离心管倒扣在纸巾上除去残留的液体培养基。注：培养基残留可能会导致质粒得率下降。
2. 加入**10 mL Buffer A1**（确保已加入RNase A），使用移液器吹打或涡旋震荡，使细菌充分悬浮，无菌块。注：充分悬浮细菌对后续菌体裂解及裂解液的中和十分重要。
3. 加入**9 mL Buffer B1**（确保无沉淀析出或已通过加热方式溶解沉淀），温和反转**5-10次**，然后静置**5 min**至溶液粘稠而澄清。注：静置时间不超过5 min，时间过长会导致基因组DNA污染或质粒受损。
4. 加入**2.4 mL Buffer N3**，温和反转**5-10次**，至溶液充分混匀，此时出现白色絮状沉淀。注：裂解液须充分混合，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。
5. **室温，≥14,000 ×g**离心**10 min**。注：若上清中仍有白色沉淀，可将上清转移到新的离心管中，**≥14,000 ×g**离心**5 min**。
6. 小心转移上清至新的50 mL离心管中（避免吸起沉淀）。
7. 加入上清体积**0.1倍**的**EndoClean Buffer**（若EndoClean Buffer粘稠难吸，可将枪头剪掉头后再吸取），颠倒混匀后**冰浴10 min**，其间不时摇匀。注：加入EndoClean Buffer后溶液变红并浑浊，冰浴后溶液变清亮。
8. **65°C**水浴**5 min**，使溶液温度恢复到23°C以上（否则离心后溶液不分层），此时溶液重新变浑浊。

9. **室温**，**10,000 ×g**离心**5 min**（或**2,500 ×g**离心**15 min**），溶液分为两层，质粒在上层水相，内毒素在下层红色有机相。注：此时约可去除99%的内毒素，重复7-9步可使内毒素含量低于0.1 EU/μg DNA。若离心后上层水相漂浮部分红色小液珠，可静置几分钟，待其自然下沉。上层残留的红色液体在洗涤时会被一并洗去，不影响实验结果。
10. 小心将上层水相转移至新的50 mL离心管中（避免吸取下层红色有机相），加入上清体积**0.1倍**的**3M NaAC (pH 5.2)**或者**3M KAC (pH 5.2)**，以及**0.7-1倍**体积的**异丙醇**，颠倒混匀。
11. **4°C**，**≥14,000 ×g**离心**20 min**，此时将出现质粒DNA沉淀；小心倒去上清，并用枪头吸弃沉淀上残留的液体。注：质粒DNA离心后沉淀在离心管侧壁，有时可能无法看到明显的DNA团块。
12. 加入**5 mL Buffer KB**，将沉淀轻轻弹起，**室温**放置**5 min**；
13. **4°C** **12,000 ×g**离心**5 min**，小心倒去上清，并用枪头吸弃沉淀上残留的液体。注：此时沉淀将变得透明或半透明，倾倒上清时要小心，不要将沉淀倒出。
14. 加入**5 mL 70%的乙醇**，将沉淀轻轻弹起，**室温**放置约**5 min**，**4°C**，**12,000 ×g**离心 **5 min**，将上清小心倒出，用枪头吸弃沉淀上残留的液体。注：此时透明沉淀将重新变成白色沉淀。
15. 重复上一步。
16. **4°C**，**5,000 ×g**离心**1 min**，用枪头吸弃沉淀上残留的液体。
17. 将离心管在空气中风干，或者置于烘箱中**55°C**烘干**5 min**，以彻底去除酒精残留。注：避免过分干燥，否则质粒DNA沉淀不容易溶解。
18. 加入**1-1.5 mL Endofree Elution Buffer**或**ddH₂O**，可**65°C**水浴或用宽口吸管轻轻吹打辅助溶解。
19. 将质粒DNA溶液转移至新的无核酶/无内毒素/无热源的1.5mL离心管中备用。

问题指南

问题	可能的原因	建议
产量低	细胞裂解不充分	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	增加菌液用量和 A1, B1 和 N3 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 分钟
RNA 污染	RNase A 没有加入到 Buffer A1	将 RNase A 添加到 Buffer A1 中.

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。如需技术支持或了解更多产品信息，请致电与我们联系，或访问我们的网站



全国服务热线：400-115-2855

技术邮箱：tech@beiwobiomedical.com

市场邮箱：market@beiwobiomedical.com

倍沃官网：www.beiwobiomedical.com