

质粒大提试剂盒简明说明书（BW-PD1511）

Ver: 1912

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。核酸最终通过无菌水或者 Elution Buffer 洗脱。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 150-200 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 1.5 mg 质粒 DNA。200 mL 菌液的得率大约在 1.5 mg。

纯化得到的质粒可用于下游应用, 例如转染 HEK293 等健壮细胞、克隆/亚克隆、RFLP、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
Collection Tubes	2	10	25
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	130 mL	2×170 mL
DNA Wash Buffer*	5 mL	24 mL	54 mL

Elution Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
RNase A (20 mg/mL)	110 µL	550 µL	1.35 mL
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 20 mL (BW-PD1511-00) 或 96 mL (BW-PD1511-01) 或 216 mL (BW-PD1511-02) 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 ×g。
- 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。所有试剂及用品可保存于室温（15-25℃）。加入 RNase A 的 Buffer A1 应储存于 4℃。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 高速离心机
- 50 mL 离心管

操作步骤（离心法）

1. 接种新鲜的 100 µL 菌液到 150-200 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：请勿使用超过 200 mL 的菌液或者细胞量大于 550。若超过 200 mL 菌液量, 对应 Buffer 的使用量应加大。

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. 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：残留培养基将造成裂解不充分及低的产量。

3. 柱平衡: 向吸附柱 Maxi Column 中加入 2.5 mL 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 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（不要涡旋）。室温静置 5 min 直至溶液澄清。

注：孵育时间不要超过 5 min, 过长时间孵育会造成基因组 DNA 污染和质粒损伤。

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 3 mL Buffer C1, 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：若菌液的 RNA 量较多，可静置 10 min 使 RNA 酶充分发挥作用。
注：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。

7. 两种方案可供选择：

高速离心：将裂解液转移至一个高速离心管，12,000 ×g 离心 10-15 min。将澄清的裂解液转移至一个 50 mL 离心管（避免吸到漂浮的沉淀）

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。

使用 Filter Syringe：将裂解液直接倒入 Filter Syringe，将 Filter Syringe 插入一个干净的架在架子上的 50 mL 离心管（未提供），静置 10 min，可看见白色沉淀漂浮至顶部。握住 Filter Syringe 和 50 mL 离心管，轻轻推动助推器至底部，当阻力太大时停止下压，可能在 Filter Syringe 内留下部分裂解液，不要强迫残留的裂解液通过 Filter Syringe。

8. 转移澄清的裂解液至 50 mL 离心管（避免吸到漂浮的沉淀），加入 **9 mL Buffer C1** 和 **10 mL** 无水乙醇，剧烈震荡快速混匀，混合液需要立即转移至 DNA 柱。

9. 立即将 18 mL 的混合物转移至 **Maxi Column**，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液。加入剩余的混合液至 **Maxi Column**，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。

注：Maxi Column 最大可容纳 20 mL 液体，若混合液有 20 mL，请于室温静置 2-5 min（避免离心过程中液体撒出）。

10. 加入 **10 mL DNA Wash Buffer** 至 **Maxi Column**，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。

11. 加入 **10 mL** 无水乙醇，8,000 ×g 离心 1 min，弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。

12. 开盖，将柱子放回 50 mL 离心管，10,000 ×g 离心 10 min。

注：乙醇是否去除干净至关重要，空离后将柱子放入 50-60℃烘箱 10min 可更好的去除残留乙醇。

13. 将 **Maxi Column** 转移至一个干净的 50 mL **Collection Tube**，在膜中央加入 **1.5-2 mL Elution Buffer**（55℃预热）或无菌 ddH₂O，室温静置 1 min，10,000 ×g 离心 5 min 洗脱质粒 DNA。

可选：将洗脱下来的液体二次上柱洗脱。

注：第一次洗脱可得到约 70%质粒 DNA，将洗脱下来的 DNA 二次上柱可得到另外 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/亚克隆、RFLP、文库筛选、体外翻译、测序、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，强烈建议使用去除内毒素试剂盒（PD1514）。

14. DNA 浓度可通过以下方式计算，

DNA 浓度 (μg/mL) = OD_{260nm} × 50 × 稀释倍数

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。最高使用 400 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1 和 C1，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，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 和 C1。
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

