

质粒小提试剂盒简明说明书（BW-PD1812）

Ver: 2409

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统，96 孔结合柱可高效专一结合质粒，而蛋白质和其他杂质通过漂洗液去除，质粒通过无菌水或者 Elution Buffer 洗脱。

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

*使用前请将 160 mL (BW-PD1812-00)或 320 mL (BW-PD1812-01) 或 400 mL (BW-PD1812-02) 96-100% 乙醇加入至 DNA Wash Buffer 瓶内。.

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 160 mL (BW-PD1812-00)或 320 mL (BW-PD1812-01) 或 400 mL (BW-PD1812-02) 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 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
- 96 孔板离心机
- 负压装置

操作步骤（负压/离心法）

Catalog#	BW-PD1812-00	BW-PD1812-01	BW-PD1812-02
Preps	96	96 x 4	96 x 20
96-Deep Well Plates (1.6 mL)	1	4	20
96-Well DNA Plates	1	4	20
96-Well Lysate Clearance Plates	1	4	20
96-Well Elution Plates	1	4	20
Breathable Films	1	4	20
Sealing Films	4	16	80
Buffer GBL	60 mL	240 mL	2 x 500 mL
Buffer A1	30 mL	110 mL	2 x 300 mL
Buffer B1	30 mL	110 mL	2 x 300 mL
Buffer N1	40 mL	160 mL	2 x 400 mL
DNA Wash Buffer*	40 mL	2 x 80 mL	8 x 100 mL
Buffer KB	55 mL	240 mL	3 x 400 mL
Elution Buffer	25 mL	100 mL	450 mL
RNase A(20mg/mL)	150 µL	550 µL	2 x 1.5 mL
Use Manual	1	1	1

1. 在含 1-1.5mL LB 培养基（含适量抗生素）的 96-well 2.2 mL Plate 中接种菌种，摇床 37℃ 培养 14-16 个小时。

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，大肠杆菌开始降解，质粒产量会降低。

注：不要直接从甘油保存的菌种中取菌液培养。

注：该过程最好用 LB 培养基培养大肠杆菌。当使用 TB 或 2×YT 培养基，需要特别注意保证细胞密度不超过 3.0（OD600）。如果使用过量的菌液，须相应地提高 Buffer 的用量。

2. 柱平衡：向 96-Well DNA Plates 每孔 中加入 500 µL Buffer GBL，3000xg 离心 5 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. 室温下 3,000 x g 离心 10 min，收集菌体，将上清倒掉，并将 96 孔板倒扣在纸巾上以除去残留的培养基。

4. 加入 250 µL Buffer A1（确保已加入 RNase A），加盖封面膜，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。

5. 撕去封面膜，加入 250 µL Buffer B1，加盖封面膜，温和地反转 10 次以混合均匀(不要涡旋)，然后静置 5 min 至溶液粘稠而澄清，如果有必要，持续混匀。

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，使用前请于 50℃ 加热溶解。

6. 撕去封面膜，加入 350 µL Buffer N1，加盖封面膜，立即反转多次，至溶液充分混匀，此时出现白色絮状沉淀。

注：将裂解液置于冰上 1 min 有助于提高质粒产量。

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，则需继续混合至完全中和裂解液。

7. 根据制造商指南安装负压设备，将 96-Well Lysate Clearance Plates/96-Well DNA Plates 放置到负压装置上。

8. 小心将裂解液转移至 96-Well Lysate Clearance Plates/96-Well DNA Plates 中，打开负压装置，抽滤 5-10min，根据实际情况调整抽滤时间，直到全部滤液抽干，关闭负压装置，弃除 96-Well Lysate Clearance Plates 和滤液。

9. **可选：**向 96-Well DNA Plates 中每孔加入 **500 μL Buffer KB**，打开负压装置抽干溶液。

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. 向 96-Well DNA Plates 中每孔加入 **750 μL DNA Wash Buffer** (使用前按要求加入乙醇)，打开负压装置抽干溶液，弃除滤液。

可选：重复步骤 10。

11. 使用最大负压继续抽滤 10min，抽干吸附柱。如柱头有液滴请使用吸水纸吸干。

注：乙醇是否去除干净将会影响最后的洗脱效率。

12. 将 96-Well DNA Plates 转移至 96-Well Elution Plates 中，向 96-Well DNA Plates 中每孔加入 **100-150 μL Elution Buffer** 或 ddH₂O（65℃提前预热），静置 2min，使用最大负压抽滤 5-10min 洗脱质粒 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，

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

操作步骤（离心法）

1. 按照负压步骤 1-6 进行操作。

2. 将 96-Well Lysate Clearance Plates 放在 96-Deep Well Plates 上方，转移裂解液（≤750 μL）至 96-Well Lysate Clearance Plates 对应孔中，3,000 ×g，离心 5 分钟，弃除 96-Well Lysate Clearance Plates。

3. 将 96-Deep Well Plates 上清对应转移至 96-Well DNA Plates，再将 96-Well DNA Plates 放在 96-Deep Well Plates，3000xg，离心 5 分钟。弃除 96-Deep Well Plates 滤液，再放回。

4. **可选：**向 96-Well DNA Plates 中每孔加入 **500 μL Buffer KB**，3,000xg，离心 5 分钟，弃除 96-Deep Well Plates 滤液，再放回。

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. 向 96-Well DNA Plates 中每孔加入 **750 μL DNA Wash Buffer**，3,000xg，离心 5 分钟，弃除 96-Deep Well Plates 滤液，再放回。重复步骤 5。

6. 将 96-Well DNA Plates，3000xg，离心 10 分钟。

7. 将 96-Well DNA Plates 转移至 96-Well Elution Plates 中，向 96-Well DNA Plates 中每孔加入 **100-150 μL Elution Buffer** 或 ddH₂O（65℃提前预热），静置 2min，3000xg，离心 10 分钟，洗脱质粒 DNA。

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。
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	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



倍沃医学