

质粒中提试剂盒 II 简明说明书 (BW-PD1412)

Ver: 1912

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, Midi Column II 高效吸附 DNA, 同时蛋白质和其他杂质通过漂洗液去除。

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 50-100 mL 大肠杆菌培养液中快速高效地提取质粒, 提供的 Midi Column II 可结合至多 500 µg 质粒 DNA。

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
Midi Columns II	2	10	25
Collection Tubes	2	10	25
Buffer GBL	7.5 mL	30 mL	70 mL
Buffer A1	12 mL	55 mL	135 mL
Buffer B1	12 mL	55 mL	135 mL
Buffer C1	15 mL	70 mL	170 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	12 mL	30 mL
RNase A (20 mg/mL)	60 µL	275 µL	675 µL
Elution Buffer	5 mL	15 mL	30 mL
User Manual	1	1	1

要点

- RNase A: 20 mg/mL。室温下 (15-25°C) 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°C 保存。
- DNA Wash Buffer: 使用前请将 12 mL (BW-PD1412-00) 或 48 mL (BW-PD1412-01) 或 120 mL (BW-PD1412-02) 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°C 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°C) 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°C)。加入 RNase A 的 Buffer A1 应储存于 4°C。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 50 mL 离心管
- 高速离心机

操作步骤 (离心法)

1. 接种新鲜的 100 µL 菌液到 50-100 mL LB 培养基 (含适量抗生素), 37°C 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°C 的菌液。

注: 请勿使用超过 100 mL 的菌液或者细胞量大于 250。若超过 100 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. 柱平衡: 向吸附柱 Midi Column II 中加入 2.5 mL Buffer GBL, 8000 rpm 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. 8000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 将管子倒置于纸巾上, 去除残留培养基。

4. 加入 5 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: 充分重悬有利于菌体裂解和中和。

5. 加入 5 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: 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°C 预热 Buffer B1 使沉淀溶解。

6. 加入 2 mL Buffer C1, 立即反转或震荡 5-10 次以混匀。

注: 冰上静置 1 min 有助于减少步骤 6 的蛋白漂浮。

注: 混合均匀, 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. 小心地转移上清至 50 mL 离心管 (避免吸到漂浮的沉淀), 加入 **4 mL Buffer C1** 和 **5 mL** 100%乙醇, 剧烈震荡以混匀, 将混合液转移至 DNA 柱。

9. 快速转移 15 mL 的上述混合液至一个 **Midi Column II**, 8000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将柱子放回收集管。将剩余样品转移至柱子, 8000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将柱子放回收集管。

10. 加入 **5 mL DNA Wash Buffer** 至 **Midi Column II**, 8000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

11. 加入 **5 mL** 100%乙醇, 8000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

12. 将 **Midi Column II** 开盖, 放回 50 mL 离心管中, 8000 rpm 离心 10 min 去除残留的乙醇。

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。

13. 小心地将 **Midi Column II** 转移至一个干净的 50 mL **Collection Tube**, 在膜中央加入 **0.5-1 mL Elution Buffer** (预热 55°C) 或灭菌的 ddH₂O, 室温静置 1 min, 8000 rpm 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 (PD1415)。

14. DNA 浓度可通过以下方式计算,

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

低拷贝数质粒和柯斯质粒的纯化

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 $\mu\text{g/mL}$, 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。最多使用 150 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, 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 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°C。请勿将菌液置于 4°C过夜。
	质粒拷贝数低	增加培养基和 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 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

