



无内毒素 96 孔质粒小提试剂盒（过滤法）
(BW-PD1818)

Ver: 2310

产品简介

试剂盒采用本司特殊的质粒结合系统、过滤系统以及去内毒素方法，单次可纯化 96 个高质量、低内毒素的质粒，具有高通量、高效率和高质的特点。

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 后的 Buffer A1 应储存于 4℃。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 96 孔深孔板真空负压装置
- 96 孔深孔板离心装置
- 96 孔深孔板（2.2mL）
- 烘箱（70℃）

安全提示

Buffer N3、Buffer RET 和 Buffer KB 属于高盐溶液，请注意带手套操作

产品构成

Catalog#	BW-PD1818-00	BW-PD1818-01	BW-PD1818-02
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 N3	15 mL	60 mL	300 mL
Buffer RET	30 mL	110 mL	2 x 270 mL
DNA Wash Buffer	40 mL	2 x 80 mL	8 x100 mL
Buffer KB	55 mL	240 mL	3 x 400 mL
EndoFree 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

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-PD1818-00) 或

320 mL (BW-PD1818-01) 或 400 mL (BW-PD1818-02) 96-100%乙醇加入至每个 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。
- Buffer N3 保存时可能会形成沉淀，加热至 37℃可溶解。
- 在室温下（15-25℃）进行所有离心操作。

操作步骤（离心法）

1. 将单个菌落分别接种到含有 **1-1.5 mL** LB 培养基（含适量抗生素）的 96 孔板（2.2 mL）中，覆膜后 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：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 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. 将摇菌板覆膜后室温下，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。

注：残留的培养基将会导致裂解不充分而造成低 DNA 得率。

4. 每孔加入 **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：充分重悬对于细菌裂解和裂解液中和是至关重要的。

5. 每孔加入 **250 μL Buffer B1**，轻轻地反转 10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 2~3 min。

注：静置时间不要超过 5 min。

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. 每孔加入 **125 μL Buffer N3**，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：若混合物仍然呈团块、褐色、粘稠状，一定要混合均匀，需要更充分混匀来完全中和。

7. 将 **96-Well Lysate Clearance Plates** 放置于 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)** 上，小心将裂解液转移至 **96-Well Lysate Clearance Plates**，静置 10 分钟，待白色絮状物漂浮至液面上方，放置于板式离心机 3,000×g 离心 5 min。

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。

8. 向 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)** 上清中加入 **250 μL Buffer RET** 和 **250 μL** 的 100%乙醇，覆膜后，手动震荡以混匀。

9. 转移上述混合液至 **96-Well DNA Plates** 中，转移结束后将 **96-Well DNA Plates** 放于 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)** 上方，3000 ×g 离心 5 min，**96-Deep Well Plates (1.6 mL)** 滤液去除，将 **96-Well DNA Plates** 放回 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)**。

10. **可选：**加入 **500 μL Buffer KB** 至 **96-Well DNA Plates**，3000 ×g 离心 5 min，弃滤液，将 **96-Well DNA Plates** 放回 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)**。

注：此步骤对于 endA-菌株例如 DH5α 和 TOP10 而言不是必要的，Buffer KB 对于 endA+菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的。

11. 加入 **700 μL DNA Wash Buffer**（使用前按要求加入乙醇），3000 ×g 离心 5 min，弃滤液，将 **96-Well DNA Plates** 放回 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)**。

12. 重复步骤 11。

13. 将 **96-Well DNA Plates** 放置于通风橱中，将多余的乙醇挥发出去，或者可将 **96-Well DNA Plates** 放置于 70℃烘箱中 10 分钟。

注：该步骤至关重要，去除残留乙醇。

14. 将 **96-Well DNA Plate** 放置在 **96-Well Elution Plates** 上，在膜中央加入 **100~150 μL** 无热原水或 **EndoFree Elution Buffer**（65℃预热），静置 2 min，3000 ×g 离心 5 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：第一次洗脱可得到约 70%的质粒 DNA，二次洗脱可回收到剩余 20-30%的质粒。

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：质粒 DNA 可用于内毒素敏感细胞系、原代细胞的转染或显微注射。

15. DNA 浓度的确定，

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

操作步骤（负压/离心法）

1. 根据制造商指南安装负压设备，将连接到负压装置上。

2. 按照离心步骤 1-5 进行操作。

3. 先将 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)** 放置在装置中，再将 **96-Well Lysate Clearance Plates** 放置其上方，将裂解液转移至 **96-Well Lysate Clearance Plates** 中，静置 10 分钟，待白色絮状物漂浮至液面上方，打开负压装置，收集流穿液。

4. 向 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)** 上清中加入 **250 μL Buffer RET** 和 **180 μL** 的 100%乙醇，覆膜后，手动震荡以混匀。

5. 转移上述混合液至 **96-Well DNA Plates** 中，转移结束后将 **96-Well DNA Plates** 放于 **96-Deep Well Plates (1.6 mL)** 上方，打开负压装置，弃滤液；

6. **可选：**加入 **500 μL Buffer KB** 至 **96-Well DNA Plates**，打开负压装置，弃滤液。

注：此步骤对于 endA-菌株例如 DH5α 和 TOP10 而言不是必要的，Buffer KB 对于 endA+菌株例如 HB101, JM110, JM101 及其衍生菌株是必要的。

7. 加入 **700 μL DNA Wash Buffer**，打开负压装置，弃滤液。关闭负压装置。

重复步骤 7。

8. 打开负压装置，空抽 5 min 以干燥柱子，去除乙醇残留。

9. 将 **96-Well DNA Plate** 放置在 **96-Well Elution Plates** 上，在膜中央加入 **100 μL~150 μL** 无热原水或 **EndoFree Elution Buffer**（65℃预热），静置 2min，打开负压装置洗脱质粒 DNA。

可选：将洗脱下来的液体重新上柱，二次洗脱。

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。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, N3 和 RET，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，EndoFree 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	增加培养基和对应 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	Buffer A1 中未加 RNase A	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。
96 孔过滤板堵塞	加入 N3 试剂后没混匀或没待絮状沉淀上浮至上方	上下颠倒混匀, 结束后涡旋 10 秒; 静置 5-10 分钟, 待絮状沉淀漂浮至上方再打开负压装置。

杭州倍沃医学科技有限公司

BIOMIGA（中国）

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwobiomedical.com

