

## 无内毒素质粒大提试剂盒（增强型）

V202511

(BW-PD1515)

## 产品简介

本试剂盒采用高效DNA结合系统、独特过滤器及去内毒素试剂Buffer LER可有效将内毒素、蛋白等其他杂质有效去除，内毒素水平低于0.1 EU/ $\mu$ g。纯化的无内毒素质粒可用于酶切、PCR、测序、连接转化和内毒素敏感细胞系、原代培养细胞的转染等。每次可处理100-150 mL菌液，获得至多1.2 mg转染级质粒。

## 试剂盒组成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2T	10T	25T
Buffer GBL	6 mL	30 mL	75 mL
LyseBlue	110 $\mu$ L	550 $\mu$ L	1.35 mL
Buffer A1	22 mL	110 mL	250 mL
Buffer B1	22 mL	110 mL	250 mL
Buffer N3	22 mL	110 mL	250 mL
Buffer LER	8 mL	40 mL	100 mL
DNA Wash Buffer 1	22 mL	110 mL	250 mL
DNA Wash Buffer 2*	11 mL	55 mL	125 mL
RNase A (60 mg/mL)	110 $\mu$ L	550 $\mu$ L	1.35 mL
EndoFree Elution Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
Maxi Columns	2 个	10 个	25 个
50 mL Collection Tubes	2 个	10 个	25 个
60 mL Filtration ER1	2 个	10 个	25 个
User Manual	1 份	1 份	1 份

## 产品贮存及稳定性

所有试剂及耗材室温（15-25℃）保存，产品有效期自生产之日起12个月；LER收到后存放于4℃，加入RNase A后的Buffer A1后应储存于4℃，可稳定存放6个月。

## 使用前注意事项

- **Buffer A1**: 在使用前加入对应的RNase A, 混匀后置于4℃冰箱保存。
- **LyseBlue**: 中和指示剂, 可选用。使用时按照**LyseBlue: A1=1:200**进行混合, 加入B1为蓝色, 加入N3变为无色。
- **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。
- **DNA Wash Buffer 2\***: 使用前请将标示量的无水乙醇加入至每个DNA Wash Buffer 2\*瓶内并打钩。
- **60 mL Filtration ER1 (过滤器)**: 请将推柄轻轻地抽出, 避免滤膜松动而导致过滤效果受影响; 同时裂解上清加入后请缓慢匀速推动过滤。

## 提取得率

表 1 常规质粒及其产量

质粒类型	菌液量	推荐ODV	预期得率
低拷贝	200-300mL	400-600	50-300μg
高拷贝	100-150mL	200-300	500-1200μg

注:  $ODV = OD_{600} \times \text{菌液体积 } V$ 。

**宿主菌信息**: 用于质粒的宿主菌对质粒产量有显著影响。诸如 TOP10、DH5α 和 C600 等宿主菌株可产生高质量的质粒 DNA。EndA+菌株如 JM101、JM110、HB101、TG1 及其衍生物, 由于裂解过程中释放的内源性核酸内切酶或高碳水化合物, 通常会导致质粒产量较低。如果产率未达到预期, 我们建议将质粒转化为 endA-菌株。有关 endA 信息, 请参阅表 2。

表 2 EndA 类型 宿主菌相关信息

End A- 宿主菌							
DH5α	DH1	DH21	JM106	JM109	SK2267	SRB	XLO
TOP10	DH10 B	JM103	JM107	SK1590	MM294	Stbl2™	XL1-Blue
BJ5182	DH20	JM105	JM108	SK1592	Select96™	Stbl4™	XL10-Gold
End A+ 宿主菌							
C600	JM110	RR1	ABLE®C	CJ236	KW251	P2392	BL21(DE3)
HB101	TG1	TB1	ABLE®K	DH12S™	LE392	PR700	BL21(DE3) pLysS
JM101	JM83	TKB1	HMS174	ES1301	M1061	Q358	BMH71-18

**操作步骤（请务必在使用本试剂盒之前阅读注意事项）**

1. 取100-150 mL过夜培养的菌液，低拷贝菌推荐使用翻倍，加入离心管中8000 rpm离心5 min进行菌体收集。

注：尽量去除培养基，残留培养基将造成裂解不充分及产量偏低。

2. 加入10 mL Buffer A1 (使用前先加入RNase A; LyseBlue:可选用)，用移液器或涡旋震荡仪充分悬浮细菌细胞。

注：充分重悬对于裂解和获得最佳产量是至关重要的。

3. 加入11 mL Buffer B1，柔和地上下反转10次混匀整个体系，室温静置不超过5 min直至获得澄清的裂解液。

注：若是使用LyseBlue此时溶液呈现蓝色，孵育时间不要超过5 min，不要涡旋，过长时间孵育会造成基因组DNA污染和质粒损伤。

4. 柱平衡步骤：在裂解等待时间可以向Maxi Columns吸附柱中加入2.5 mL Buffer GBL，8000 rpm离心2 min，倒掉收集管内的废液，吸附柱处于待使用状态。

注：平衡后的吸附柱当天使用。

5. 加入11 mL Buffer N3，立即手动上下颠倒震荡8-10次混匀，充分混匀后离心机内10000 rpm离心5 min，完成后取出将溶液轻轻倒入过滤器Filtration ER1中，缓慢地推动推柄，下面使用新的50 mL离心管（自备）进行收集。

注：中和混匀时应呈现无色，若混合物仍然呈团块蓝色、粘稠状，加大混匀力度和次数保证中和效果，避免倒入大量沉淀到过滤器中导致过滤器被堵塞。

6. 加入4 mL Buffer LER，手动上下颠倒20次以混匀，之后加入混合液总量0.3倍体积的异丙醇（大约9 mL）进行混合并立即上柱离心。

7. 立即转移15 mL左右的混合液至Maxi Column（插在50 mL Collection Tube），8000 rpm离心1 min。弃滤液，将Maxi Column放回收集管。重复此步骤直至所有混合液通过。

注：Maxi Column最大可容纳18 mL液体，若混合液过多需要多次过柱（避免离心过程中产生漏液现象）。

8. 加入10 mL DNA Wash Buffer 1，8,000 rpm离心1 min；弃废液并加入10 mL DNA Wash Buffer 2，8,000 rpm离心1 min；重复洗涤2并弃废液，完成后将Maxi Column放回收集管。

9. 将柱子放回50 mL离心管，8,000 rpm空离5 min或者10,000 rpm空离2 min，去除残留液体，完成后将Maxi Column放到新的收集管中室温静置晾干5 min。

10. 在膜中央悬空加入1-2 mL EndoFree Elution Buffer（65℃预热）或无菌ddH<sub>2</sub>O，室温静置2 min，10000 rpm离心1 min洗脱质粒DNA，将洗脱下来的液体二次上柱洗脱即可。将洗脱液转移到无内毒的离心管中，-20℃保存。

注：为了保证浓度，用户可根据自身需求选择合适的洗脱体积。

## 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  $\mu\text{g/mL}$ ，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，若是菌液OD600较小，最高使用体积为300 mL。
- 使用2倍体积的Buffer A1，B1，N3和Buffer LER。这些缓冲液可单独购买。

## 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，会导致与空气接触失效，可重新购买Buffer B1
	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。
	质粒拷贝数低	增加培养基和Buffer A1,B1,C1和Buffer LER的体积。
没有DNA	质粒在宿主菌内丢失	菌液保存不当，建议培养前划线平板活化菌种，以稳定产量。
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，使用后及时放到4°C保存。
纯度低	盐离子残留	沿吸附柱的管壁四周加入洗涤液，加完洗涤液后多静置一段时间
	乙醇残留	可适当加大空转的速度或者增加开盖静置挥发乙醇的时间

## 购买须知

根据说明书使用时，本产品保证性能符合产品标示和倍沃文献中的描述。倍沃不提供任何其他类型的明示或暗示保证，包括但不限于适销性或特定用途适用性等。倍沃对违反本保证的唯一义务和购买者的唯一补救措施是由倍沃选择更换产品。倍沃对因使用产品、使用产品结果或无法使用产品而引起的任何直接、间接、后果性或附带损害不承担任何责任。如需技术支持或了解更多产品信息，请致电 **400-115-2855** 与我们联系。

登录官方网站获取产品手册等更多信息：<http://www.beiwobiomedical.com/>

