



过滤法无内毒素快速质粒中提试剂盒说明书 (BW-PD1422)

Ver: 202508

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, Midi 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 EndoFree Elution Buffer 洗脱。纯化后的质粒 DNA 不含胍盐/阴离子交换树脂残基。

本试剂盒使用一种特殊配方的缓冲液, 可从质粒 DNA 中提取内毒素。内毒素水平低至 1-10 EU 每 1 μ g 质粒 DNA。

本试剂盒适用于从 15-50 mL 大肠杆菌培养液中提取质粒, 提供的 Midi Column 可结合至多 250 μ g 质粒 DNA。纯化得到的无内毒素质粒可用于下游应用, 例如内毒素敏感细胞系、原代培养细胞的转染或显微注射。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自之日起可保存 12 个月。所有试剂及用品可保存于室温 (15-25°C)。加入 RNase A 后的 Buffer A1 后应储存于 4°C。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Midi Columns	2	10	25
15 mL Collection Tubes	2	10	25
ezFilter Syringe (20 mL)	2	10	25

Buffer GBL	3 mL	12 mL	30 mL
Buffer A1	6 mL	30 mL	70 mL
Buffer B1	6 mL	30 mL	70 mL
Buffer N3	2 mL	10 mL	24 mL
Buffer RET	6 mL	30 mL	70 mL
DNA Wash Buffer*	3 mL	12 mL	24 mL
EndoFree Elution Buffer	3 mL	15 mL	40 mL
RNase A	30 μ L	150 μ L	350 μ L
User Manual	1	1	1

要点

- RNase A: 4-25°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-PD1422-00) 或 48 mL (BW-PD1422-01) 或 120 mL (BW-PD1422-02) 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。
- Buffer N3 在保存时可能形成沉淀, 使用前请于 37°C 水浴加热溶解。
- 确保离心机转速可达 12,000 \times g。
- 在室温下 (15-25°C) 进行所有离心操作。

实验前需准备的材料

- 96-100% 乙醇
- 高速离心机

- 15 mL 离心管

操作步骤 (过滤法)

1. 接种新鲜的 100 μ L 菌液到 **15-50 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 50 mL 的菌液或者细胞量大于 150。若超过 50 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 Columns** 中加入 **1mL Buffer GBL**, 10,000 \times 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)。

3. 将收集的菌液 5,000 \times 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。

4. 加入 **2.5 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: 充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的。

5. 加入 **2.5 mL Buffer B1**, 轻轻地反转 10 次以混匀(不要涡旋), 室温静置 5 min 直至获得澄清的裂解液。

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 低于室温时易产生沉淀, 使用前请于 37°C 温浴溶解。

6. 加入 **750 μ L Buffer N3**, 立即反转或震荡 5-10 次混匀。

注: 冰上静置 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. 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 $\times g$ 离心 10-15 min。将澄清的裂解液转移至一个 15 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 15 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 15 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. 小心将上清液转移至一个干净的 15 mL 离心管中 (避免吸到沉淀), 加入 **2.5 mL Buffer RET** 和 **2.5 mL** 无水乙醇, 剧烈震荡以混匀, 将混合液转移至 DNA 柱。

9. 转移 4 mL 的混合液至 **Midi Column** (插在 **15 mL Collection Tube**), 10,000 $\times g$ 离心 1 min。弃滤液, 将 **Midi Column** 放回 **15 mL Collection Tube**。再将剩余的混合液上柱, 10,000 $\times g$ 离心 1 min。弃滤液并将柱子放回收集管中。

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

10. 加入 **4 mL DNA Wash Buffer** 至 **Midi Column**, 10,000 $\times g$ 离心 1 min, 弃滤液。

11. 加入 **4 mL 100%乙醇**, 10,000 $\times g$ 离心 1 min, 弃滤液。

12. 将 **Midi Column** 开盖, 放回 15 mL 离心管中, 10,000 $\times g$ 离心 10 min。

注: 残留的乙醇可通过打开柱盖离心的方式去除, 乙醇是否去除干净至关重要。

13. 将 **Midi Column** 转移至一个干净的 **15 mL Collection Tube**, 在膜中央加入 **0.3-0.5 mL EndoFree Elution Buffer** (提前 65°C 预热) 或无菌 ddH₂O, 室温静置 1 min, 10,000 $\times g$ 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。

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。最高使用 100 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1, B1, N3 和 RET。这些额外的缓冲液可单独向本公司购买。
- 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 Buffer A1,B1,N3 和 RET 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.beiwbobiomedical.com

400-115-2855

sales@beiwbobiomedical.com

