

无内毒素质粒大量提取试剂盒（柱式法）

（BW-PD1520）

Ver: 260801

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Maxi Columns	2	10	25
50 mL Collection Tubes	2	10	25
Buffer GBL	8 mL	30 mL	70 mL
Buffer A1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer B1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer N3	10mL	40mL	90mL
Buffer RET	22 mL	110 mL	270 mL
DNA Wash Buffer*	5 mL	24 mL	54 mL
EndoFreeElution Buffer	5 mL	25 mL	60 mL
RNase A	110 μ L	550 μ L	1.35 mL
User Manual	1	1	1

产品简介

本试剂盒采用专利 DNA 结合系统, Maxi 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 Elution Buffer 洗脱。

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。

该系统使用一种特殊配方的缓冲液, 可从细菌裂解液中提取内毒素。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 150-200 mL 大肠杆菌培养液中提取质粒, 提供的 Maxi Column 可结合至多 1200 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 后的 Buffer A1 后应储存于 4°C。

要点

- **RNase A:** 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 20 mL (BW-PD1520-00) 或 96 mL (BW-PD1520-01) 或 216 mL (BW-PD1520-02) 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°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** 低于 10°C 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, 特别是当裂解液与乙醇混合后, 需要立即离心处理。
- 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

- 高速离心机或负压装置
- 50 mL 离心管

操作步骤（离心法）

注: 本试剂盒提供的溶液量是根据 OD₆₀₀ 介于 2.0-3.0 的高拷贝质粒的 200 mL 菌液提供, 若有需要, 可联系我司购买。

1. 接种新鲜的 100 μ L 菌液到 **150-200 mL** LB 培养基 (含适量抗生素), 37°C 震荡培养 14-16 h。

注: 制备初始培养菌液的最佳方法: 从新鲜的选择性培养基上挑取新鲜的单菌落至含有适量抗生素的 1 mL LB 培养基内, 37°C, 震荡 (约 250 rpm) 培养 6-8 h。

注: 请勿使用保存在 4°C 的菌液作为初始菌液。

注: 请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

注: 请勿使用超过 200 mL 的菌液或者细胞量大于 550, 否则请增大对应 buffer 的使用量。

2. 柱平衡: 向吸附柱 **Maxi Column** 中加入 **2.5mL Buffer GBL**, 8,000 $\times$ 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. 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。

4. 加入 **10 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。(充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的)

5. 加入 **10 mL Buffer B1**, 轻轻地反转 5-10 次以混匀 (不要涡旋), 如有必要, 请继续颠倒混匀直至溶液变得稍微澄清, 室温静置 5 min 直至获得澄清的裂解液。

6. 加入 **3 mL Buffer N3**, 立即手动震荡 5-10 次混匀, 转移裂解

液至高速离心管，12,000 x g 离心 10 min。

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。

注：若菌液的 RNA 量较多，可静置 10 min 使 RNA 酶充分发挥作用。

注：若没有高速离心机，可用 Filter syringe (PD1522 提供，或向 Biomiga 购买) 过滤裂解液。

7. 小心将 20 mL 上清液转移至一个干净的 50 mL 离心管中（避免吸到沉淀），加入 **10 mL** 的 **Buffer RET** 和 10 mL 无水乙醇，手动剧烈震荡 5 次混匀。

注：增加 **Buffer RET** 的使用量可减少质粒 DNA 内毒素的水平，然而 DNA 的得率可能会受影响。可依据下游实验来调节 **Buffer RET** 的使用量。

8. 转移 10 mL 的混合液至预处理 **Maxi Column**，8,000 x g 离心 1 min。弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。重复步骤 **8** 直至所有混合液通过。

注：若 50 mL Collection Tube 与离心机转子不匹配（例如，转子盖子不能盖住），可通过台式离心机>2,500 x g 离心 5 min。

9. 加入 **10 mL DNA Wash Buffer**，8,000 x g 离心 1 min，弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管，重复步骤 **9**。

10. 加入 10 mL 无水乙醇，8,000 x g 离心 1 min。弃滤液，将 **Maxi Column** 放回收集管。

11. 打开柱盖，8,000 x g 离心 10 min。该步骤可去除残留乙醇，以便获得最佳洗脱。再将柱子放入 50-60℃烘箱 10min 将有利于更好的去除乙醇并增加洗脱效率。

注：残留乙醇会影响 DNA 的洗脱，若离心转速低于 5,000 x g，离心 20 min 以彻底去除残留乙醇。

12. 将 **Maxi Column** 转移至一个干净的 50 mL 离心管，在膜中央加入 **1.5-2.0 mL Endofree Elution Buffer**，静置 1 min，8,000 x

g 离心 5 min 洗脱质粒 DNA。

13. 为提高质粒收获量可将洗脱下来的液体重新上柱，室温静置 1 min，8,000 x g 离心 5 min。

注：纯化得到的质粒 DNA 可直接用于下游实验例如克隆/亚克隆，RFLP，文库构建，体外翻译，测序，转染及显微注射。

注：二次洗脱可增加 DNA 产量。

14. 可选：替代步骤 12，为了最佳得率，请加入 4.0-5.0 mL Endofree Elution Buffer，室温静置 5 min，8,000 x g 离心 5 min，将洗脱下来的液体二次上柱，可获得最大的 DNA 产量。

注：对于 DNA 浓度，加入 0.1 倍体积的 3 M KAc 或 NaAc (pH5.2)，和 0.7 倍体积的异丙醇，最大速度离心 10 min，弃上清。加入 1 mL 70%乙醇，离心 5 min，小心弃上清，室温干燥 20 min 去除残留乙醇，用 Endofree Elution Buffer 重悬 DNA 沉淀。

DNA 浓度 (µg/mL) = OD_{260 nm} × 50 × 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 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。大提最高使用 400 mL。
- 使用 2 倍体积的 Buffer A1，B1，N3，RET 以及 100%乙醇，Buffer A1，B1，N3，RET 可单独向倍沃购买。
- 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℃。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,N3，RET 和 100%乙醇的体积。
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

