

过滤法无内毒素快速质粒大提试剂盒简明说明书 (BW-PD1522)

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 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。

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 µg 质粒 DNA。

本试剂盒适用于从 150-200 mL 大肠杆菌培养液中快速提取质粒, 提供的 Maxi Column 可结合至多 1.0 mg 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。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	25
Maxi Columns	2	10	25
50 mL Collection Tubes	2	10	25
ezFilter Syringe	2	10	25
Buffer A1	22 mL	110 mL	270 mL

Buffer B1	22 mL	110 mL	270 mL
Buffer N3	10 mL	40 mL	90 mL
Buffer RET	22 mL	110 mL	270 mL
DNA Wash Buffer*	5 mL	24 mL	54 mL
RNase A (20 mg/mL)	110 µL	550 µL	1.35 mL
EndoFree Elution Buffer	5 mL	25 mL	60 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 20 mL (BW-PD1522-00) 或 96 mL (BW-PD1522-01) 或 216 mL (BW-PD1522-02) 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 保存时可能形成沉淀, 使用前请于 37°C 水浴加热溶解。
- 确保离心机转速达到 12,000 ×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
- 高速离心机或负压装置
- 50 mL 离心管

操作步骤 (离心法)

1. 接种新鲜的 100 µL 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: 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: 请勿使用甘油菌直接摇菌培养。

注: 请勿使用保存在 4°C 的菌液作为初始菌液。

注: 请勿使用超过 200 mL 的菌液或者细胞量大于 550, 若菌液量超过 200 mL, 则应增大对应 buffer 的使用量。

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. 5,000 ×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。

3. 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。

注: 充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的。

4. 加入 **10 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: 孵育时间不要超过 5 min, 过长时间孵育会造成基因组 DNA 污染和质粒损伤。

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。

5. 加入 **3 mL Buffer N3**, 立即轻轻地反转 5-10 次, 再震荡 5-10 次混匀。

注: 冰上孵育 1 min 有助于增加产量。

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。

6. 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。

7. 小心将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 Buffer RET 和 10 mL 无水乙醇，手动剧烈震荡混匀。混合地裂解液立即上柱。

8. 立即转移 18 mL 的混合液至 Maxi Column，8,000 ×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：Maxi Column 最大可容纳 20 mL 液体，若混合液有 20 mL，请于室温静置 2-5 min（避免离心过程中液体撒出）。

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

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

11. 开盖，将柱子放回 50 mL 离心管，10,000 ×g 离心 10 min。

注：乙醇是否去除干净至关重要，空离后将柱子放入 50-60°C 烘箱 10 min 可更好的去除残留乙醇。

12. 将 Maxi Column 转移至一个干净的 50 mL Collection Tube，在膜中央加入 1.5-2 mL EndoFree Elution Buffer（65°C 预热）或无菌 ddH₂O，室温静置 1 min，10,000 ×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。

13. 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 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。最高使用 400 mL。
- 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 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.biomiga.com.cn

400-115-2855

info@biomiga.com.cn