



Quick-Start Protocol

Ver: 2301

UltraPure Plasmid Maxiprep Kit (Anion Exchange Chromatography)

无内毒素质粒超大量提取试剂盒（离子交换）

本试剂盒（Cat. No. **BW-PD5003**）适用于从 1000-1200 mL 菌液中快速、高效地提取高达 8mg 的高纯度质粒 DNA，内毒素含量 < 10EU/mg。提取产物可以用于酶切、测序、转化、转染等下游应用。离子交换柱可结合 8 mg 的质粒 DNA。本试剂盒 4-28℃ 保存，有效期 12 个月。

使用前注意事项

- ☐ 在 Buffer A1 中加入 RNase A 并混合均匀，混合后需 4℃ 保存。
- ☐ 若 Buffer B1 产生沉淀，37℃ 水浴 10 分钟使沉淀充分溶解。
- ☐ 【客户自备】70%乙醇、异丙醇。
- ☐ 【客户自备】无内毒素、无热原的 50 mL 离心管及其他耗材。
- ☐ 推荐：LB 培养基，培养 12-16 小时，OD600 在 2.0~3.0。

试剂盒组成

Catalog#	PD5003-01	PD5003-02	PD5003-03
Preps	2	5	10
AEC Column A	2	5	10
2 mL Microfuge Tube	6	30	30
Buffer A1	130 mL	325 mL	2X 500 mL
Buffer B1	130 mL	325 mL	2X 500 mL
Buffer N3	130 mL	325 mL	2X 500 mL
Buffer BEQ	30mL	75 mL	150 mL
Buffer BWH	240 mL	2X 300 mL	3X 500 mL
Buffer BEL	60 mL	150 mL	300 mL
Endofree Elution Buffer	24 mL	30 mL	60 mL
RNase A (20mg/mL)	700μL	1750 μL	3500 μL
控速枪头	2	5	10





推荐试剂用量

试剂名称	菌液体积	
	1000 mL	1200 mL
Buffer A1 + RNase A	60 mL	65 mL
Buffer B1	60mL	65 mL
Buffer N3	60 mL	65 mL
Buffer BEQ	15 mL	15 mL
Buffer BWH	60 mL	60 mL
Buffer BEL	25 mL	25 mL
Endofree Elution Buffer	6 mL	6mL

离子交换柱预处理

1. 重力流的方式让离子交换保存液自然滴落。
2. 加入 60ml 灭菌水让其自然滴落/靠蠕动泵 2.5r/s 的速度蠕动下来。
3. 再加 60ml 灭菌水让其自然滴落/靠蠕动泵 2.5r/s 的速度蠕动下来。

注:离子交换柱一定要进行清洗, 否则会影响其性能。

重力流方案操作步骤

以下操作过程以 1000 mL 菌液为例:

1. 在AEC Column A中加入**15 mL Buffer BEQ**, 使用重力流方式(下同)平衡离子交换柱, 弃掉过柱收集液。平衡好的AEC Column A供**第7步**使用。注: **此步骤也可以在菌液离心时进行操作。**
2. 在50 mL离心管中分两次共收集**100 mL**过夜培养的菌液/如有500ml离心瓶, 则分两次富集**500 mL**过夜培养的菌液, **室温, 6,000 ×g**离心**15min**; 弃上清, 将离心管倒扣在纸巾上除去残留的液体培养基。50ml管的则10管/12管菌样进行提取。注: 培养基残留可能会导致质粒得率下降。
3. 加入**60 mL Buffer A1** (确保已加入RNase A), 使用移液器吹打或涡旋震荡, 使细菌充分悬浮, 无菌块。注: 充分悬浮细菌对后续菌体裂解及裂解液的中和十分重要。





4. 加入**60 mL Buffer B1**（确保无沉淀析出或已通过加热方式溶解沉淀），温和反转**5-10次**，然后静置**5 min**至溶液粘稠而澄清。注：静置时间不超过5 min，时间过长会导致基因组DNA污染或质粒受损。
5. 加入**60 mL Buffer N3**，温和反转**5-10次**，至溶液充分混匀，此时出现白色絮状沉淀，充分混匀后静置**5min**。注：裂解液须充分混合，如果混合物仍然呈现圆球状、褐色或者比较粘稠，则需继续混合以完全中和裂解液。
6. **室温， $\geq 12,000 \times g$ 离心10 min**。注：若上清中仍有白色沉淀，可将上清转移到新的离心管中， $\geq 12,000 \times g$ 离心5 min。

可选方法：Filter Unit过滤法

该方式省时，方便操作，但需要自主购买Filter Unit过滤杯，且需要抽滤泵。

- (1) 将Filter Unit连接至一个无菌的500 mL或1,000 mL标准瓶（Corning#430518或430282或同等规格的耐热玻璃瓶）上并拧紧。将该装置连接至泵驱动的负压装置上。
- (2) 转移混合液底部澄清的裂解液（使用一个50 mL的移液管）至Filter Unit，静置5 min，打开负压装置，起初使用低压，5分钟后升至最大负压。
7. 小心将离心好的上清转移至**第1步预先平衡好的AEC Column A**中（避免吸起沉淀），加入上清时离子交换柱要**加上控速针头**，用来保证自滴流速，弃掉过柱收集液。
8. 在**AEC Column A**中加入**60 mL Buffer BWH**，弃掉过柱收集液。如培养时间超过16小时或者因为质粒特殊性导致内毒素偏高，可重复步骤8，则再加入60 mL Buffer BWH进行自滴。
9. 在**AEC Column A**中加入**25 mL Buffer BEL**，使用新的无内毒素的50 mL离心管（客户自备）**收集**过柱收集液。
10. 向上一步的收集液中加入**0.7倍体积的异丙醇（17.5 ml）**，颠充分摇匀后离心，**4℃，14,000xg，30min**。离心结束后小心地将除沉淀之外的上清吸弃。
11. 加入**10 mL 70%乙醇**，轻轻摇晃几下，室温离心，**14,000xg，10min**。离心结束后小心地将除沉淀之外的上清吸弃。
12. 空气中晾干5-10 min，加**2-6 mL Endofree Elution Buffer**，枪头轻轻吹打使其完全溶解。注：不可使其过于干燥，否则将难以溶解。
13. 将质粒溶液保存在2 mL Microfuge Tube中，放于-20℃保存备用。





蠕动泵控速方案操作步骤

该方案使总体时间可控，比重力流更省时，以下操作以 1000 mL 菌液为例：

1. 在AEC Column A中加入**15 mL Buffer BEQ**，利用蠕动泵平衡离子交换柱，可使其在**8min**过完交换柱，弃掉过柱收集液。平衡好的AEC Column A供**第7步**使用。**注：此步骤也可以在菌液离心时进行操作。**
2. 步骤2-6同重力流方案中的步骤2-6。
7. 小心将离心好的上清转移至**第1步预先平衡好的AEC Column A**中（避免吸起沉淀），利用蠕动泵使其在**60min**过完交换柱，弃掉流川液。
8. 在AEC Column A中加入**60 mL Buffer BWH**，利用蠕动泵使其在**15min**过完交换柱，弃掉过柱收集液。如样本培养时间超过16小时或者因质粒特殊性内毒素偏高的可重复该步骤。
9. 在AEC Column A中加入**28 mL Buffer BEL**，利用蠕动泵使其在**25min**过完交换柱，使用新的无内毒素的50 mL离心管（客户自备）**收集**过柱收集液。
10. 向上一步的收集液中加入**0.7倍体积的异丙醇（19.6 ml）**，颠充分摇匀后离心，**4℃，14,000xg，30min**。离心结束后小心地将除沉淀之外的上清吸弃。
11. 加入**10 mL 70%乙醇**，轻轻摇晃几下，室温离心，**14,000xg，10min**。离心结束后小心地将除沉淀之外的上清吸弃。
12. 空气中晾干5-10 min，加**2-6 mL Endofree Elution Buffer**，枪头轻轻吹打使其完全溶解。**注：不可使其过于干燥，否则将难以溶解。**
13. 将质粒溶液保存在2 mL Microfuge Tube中，放于-20℃保存备用。





购买需知

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信息，请致电 400-115-2855 与我们联系，或访问我们的网站 www.biomiga.com.cn。

