



磁珠法无内毒素质粒大提试剂盒

货号: C6307

规格: 20T、50T

产品介绍:

双磁珠法质粒 DNA 提取试剂盒（免离心）适用于 50-100mL 菌液中质粒 DNA 的提取，独特的试剂体系可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；提取的质粒后续可用于各种分子学实验，如转染，测序，酶切，连接和转化等。

DNA 在高盐条件下结合于硅基包被的 Magbeads 表面，经过多次清洗，去除杂蛋白等，低盐条件下洗脱，得到高纯度的 DNA。

产品信息:

试剂盒组分	20T	50T
Buffer 1	105ml	260ml
Buffer 2	105ml	260ml
Buffer 3	105ml	260ml
Buffer ETR	60ml	150ml
去内毒素磁珠	42ml	105ml
核酸吸附磁珠	4.4ml	11ml
清洗液	170ml	415ml
洗脱液	180ml	450ml
RNaseA	1.05ml	1.3ml×2

保质条件: Buffer ETR、磁珠悬液于 2-8℃保存，RNase A 于 4℃以下保存，其他组分于室温保存，有效期一年。

实验前准备:

器材: 核酸提取仪（不同型号核酸提取仪可选：QJ-AUT-24A、QP-AUT-24、QN-AUT 24 等）、恒温混匀仪、磁力架、移液器、离心机、离心管、菌液过滤柱、15mL 24 深孔板等。

试剂: 80%乙醇（无内毒素水配制，现配现用）、异丙醇。

操作步骤:

1. 离心管手动提取操作步骤-100mL 菌液

1. 取 100mL 菌液加入合适的离心管中，10000rpm 离心 10min，弃上清（菌体沉淀量约 1.0g）。用 5mL Buffer1（确认是否加入 RNaseA）充分悬浮细菌沉淀。

注：a. 不要残留细小菌块，可以使用涡旋振荡器震荡使菌体充分悬浮；

b. 若菌液量偏高或偏低，可按 Buffer1、Buffer2 和 Buffer3 相应的试剂比例提高或降低试剂用量。

2. 加入 5mL Buffer2 轻轻上下翻转混合 6-8 次，室温放置 5min，使菌体充分裂解，形成透明溶液。

注：轻轻颠倒混合，不可剧烈震荡，若使用前发现 Buffer2 出现浑浊，可以放于 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。

3. 加入 5mL Buffer3，立即上下翻转混合 6-8 次，形成紧实絮块状。室温放置 5min 后，10000rpm 离心 10min，将上清液转移至新的离心管中。

注：①如果离心后上清中还有白色沉淀，或者管底部沉淀较为松散，则继续离心 10min，上清较澄清后再进行转移上清。

②（可选，可提高纯度）离心完成转移上清时，可将上清先转移至过滤柱（过滤柱预先置于新的 50mL 离心管上）中，推动活塞将上清液过滤到 50mL 离心管中

4. 取 2mL 去内毒素磁珠于另一新的 50mL 离心管中，磁吸去掉上清液，将步骤 3 中的裂解上清液（约 12mL）转移至含去内毒素磁珠的 50mL 离心管中，震荡混匀 5min，磁吸转移上清至一新的 50mL 离心管中。

5. (此步骤后所有试剂耗材均为无内毒素处理) 加入 2.4mL Buffer ETR 颠倒混匀, 向离心管中加入 0.4 倍上清液体积的异丙醇和 200μL 核酸吸附磁珠, 室温震荡结合 5min。

注: 磁珠第一次取用前应充分涡旋混匀, 每次吸取磁珠前涡旋 2-5s, 以保证磁珠均一。

6. 将离心管置于磁力架上, 静置 1-2min, 待溶液澄清后, 尽可能吸弃上清。

7. 加入 8mL 清洗液, 涡旋震荡 1min 重悬磁珠, 而后将离心管置于磁力架上, 静置 1-2min, 待溶液澄清后, 吸弃上清。

8. 加入 8mL 80%乙醇, 涡旋震荡 1min 重悬磁珠, 而后将离心管置于磁力架, 静置 1-2min, 待溶液澄清后, 吸弃上清, 尽可能吸尽管壁上的残留液滴。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 在通风橱中通风静置 5min(确保乙醇挥发干净即可)。

11. 向磁珠中加入 1-2mL 洗脱液, 涡旋混匀, 室温震荡 5min。

注: 加入洗脱液前, 可以将洗脱液放在水浴锅中加热至 55℃, 有助于更好地洗脱质粒 DNA。

12. 将离心管置于磁力架上, 待磁吸结束溶液澄清后, 吸取上清, 转移到干净离心管中, -20℃保存备用。

2. 机提—24 通道核酸提取仪操作步骤

1. 上样准备

在 24 孔板中分别参照下表用量加入每个相应板位, 可同步完成 24 个样品的处理。

编号	1	2	3	4	5	6	8
试剂	裂解上清液 6ml	裂解上清液 6mL	内毒素去除磁珠 2ml 洗脱液 6ml	清洗液 8mL	80%乙醇 8ml	80%乙醇 8ml	洗脱液 >600ul

2. 样本处理

样本前处理过程参照【离心管手动提取操作步骤】1-3 进行, 将第 3 步上层清液各取约 6-6.5mL 分别转移至编号 1 和编号 2 的 24 深孔板中。

3. 上机处理

3.1 内毒素去除: 将准备好的 24 孔板按序对应放入 24 通道核酸提取仪中(其他同类型核酸提取仪器亦可), 并插入磁棒套; 打开仪器的操作程序 plasmid1, 选中相应的内毒素去除程序, 单击“运行”开始提取。

内毒素去除上机程序 plasmid1 参数如下:

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步
编号	3	1	2	3
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00
混合模式	1	1	1	1
混合时间	00:00:10	00:05:00	00:05:00	00:01:00
是否暂停	否	否	否	否
吸磁时间	00:02:00	00:04:00	00:04:00	00:00:00
体积	8000 μL	6500 μL	6500 μL	8000 μL
温度	—	—	—	—

3.2 质粒提取:

(1) 程序 plasmid1 运行结束后, 丢弃磁棒套, 并取出工位 1 和工位 2 中的深孔板, 分别加入 1.2mL Buffer ETR 吹打混匀 5-6 次, 然后再分别加入 100μL 核酸吸附磁珠和 0.4 倍上清液体积的异丙醇。

(2) 将准备好的 24 孔板按序对应放入 24 通道核酸提取仪中(其他同类型核酸提取仪器亦可), 并插入新磁棒套; 选中相应程序 plasmid2, 单击“运行”开始提取。

质粒提取上机程序 plasmid2 参数如下:

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步
编号	1	2	4	5	6	8	6
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:02:00	00:00:00
混合模式	1	1	1	1	1	1	1

混合时间	00:05:00	00:05:00	00:02:00	00:01:00	00:01:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:04:00	00:04:00	00:01:30	00:01:30	00:01:30	00:01:30	00:00:00
体积	9500 μL	9500 μL	8200 μL	8200 μL	8200 μL	800 μL	8200 μL
温度						37°C	

4. 核酸转移

程序运行完毕，取下洗脱板，将洗脱液转移至干净的离心管中，做好标记，-20°C保存备用。

96 通道核酸提取仪器（QN-AUT-96）“Plasmid”程序各参数设置如下：

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步
编号	1	3	4	5	6	5
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:02:00	00:00:00
混合模式	2	2	2	2	2	2
混合时间	00:05:00	00:02:00	00:01:00	00:01:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:00:00
体积	1000 μL	600 μL	600 μL	600 μL	100 μL	600 μL
温度					37°C	

注意事项：

- 使用前，将 RNaseA 全部加入 Buffer1 中混匀，2-8°C保存（若储存时间超过 6 个月需补加 RNaseA，所需 RNase 浓度为 10mg/mL，混合比例 Buffer1：RNaseA 为 100:1）；
- 使用前，检查 Buffer2、Buffer3 是否出现盐析现象；若有，可在 37°C 条件下重新溶解。