Ver: 2008

无内毒素质粒大提试剂盒（磁珠法）

（BW-MPD1520 ）

目录

产品组成 2
产品简介 2
保存条件 2
实验前准备工作 2
实验前需准备的材料 3
安全信息 3
实验步骤 3
24A 自动化提取 SOP 6
购买须知 8
附录 9

浙江省杭州市余杭区余杭塘路 2636 号风尚智慧谷 1 幢 101 室
电话：0571-56391588； 400-115-2855
http://www.beiwobiomedical.com/

产品组成

Catalog#	BW-MPD1520-A00-00	BW-MPD1520-A00-01	BW-MPD1520-A00-02	BW-MPD1520-A00-03
Preps	2	10	25	50
Plasmid beads	2 mL	8.5mL	21 mL	41 mL
Buffer A1	15 mL	55 mL	130 mL	255 mL
Buffer B1	15 mL	55 mL	130 mL	255mL
Buffer N3	5 mL	20 mL	40 mL	80 mL
Buffer RET	15 mL	55 mL	130 mL	255 mL
Buffer KB	20 mL	100 mL	230 mL	455 mL
DNA Wash Buffer*	8 mL	24 mL	54 mL	100 mL
RNase A (20 mg/mL)	150 µL	550 µL	1.4 mL	2 x 1.4 mL
Endofree Elution Buffer	10 mL	35 mL	80 mL	160 mL
User Manual	1	1	1	1

*DNA Wash Buffer：使用前请将 32 mL (BW-MPD1520-A00-00)或 96 mL (BW-MPD1520-A00-01)或 216 mL (BW-MPD1520-A00-02)或 400 mL (BW-MPD1520-A00-03) 96-100%乙醇加入至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。

产品简介

无内毒素质粒大提试剂盒（磁珠法）是采用磁珠与质粒 DNA 的可逆性吸附系统，允许 DNA 和磁珠高效结合，而蛋白质和其他污染物在一定条件下被清除。核酸很容易用无菌水或洗脱缓冲液洗脱。

无内毒素（EZgene™ EndoFree）系统使用一种特殊配方的缓冲液，从细菌裂解液中清除内毒素。经纯化后的质粒内毒素水平< 15 EU/µg 内毒素。纯化后的无内毒素 DNA 可用于各种下游应用，如内毒素敏感细胞系的转染、原代培养细胞或微注射。

本试剂盒适用于 150 mL 大肠杆菌培养质粒 DNA 的快速高效提取。可匹配自动化平台，如 Allsheng Auto-Pure 24A。

保存条件

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。RNase A 可储存于室温（15-25℃），长期储存于 4℃。Plasmid beads 可常温运输，需 4℃保存。其余试剂及用品可保存于室温（15-25℃）。

实验前准备工作

通过检查本用户手册，准备好所有组件和所有必要的材料，熟悉每一步，并特别注意以下几点。

- RNase A：使用前将提供的所有 RNase A 瞬时离心。实验前可将 RNase A 加入 Buffer A1 中混匀后使用，并于 4℃保存。
- Buffer B1：低于室温时会沉淀，请于 37℃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℃可能形成沉淀，使用前请于 37℃水浴加热溶解。
- Plasmid Beads 使用前需充分涡旋混匀。建议根据自身使用情况进行分装，避免反复开盖和涡旋降低磁珠磁性，磁珠碎片增加。
- DNA Wash Buffer：使用前请加入瓶身相应的 96-100%乙醇至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。
- 若收集管不适合高速离心机转子，或无高速离心机，可以进行低速离心后，再用过滤器过滤来收集裂解上清液。
- 在室温下（15-25℃）进行所有离心操作。

实验前需准备的材料

- 96-100%乙醇
- 水浴锅（65℃）
- 高速离心机或 ezFilter 注射器
- 50 mL 的磁力架或自动化仪器
- 50 mL 高速离心管

安全信息

Buffer N3 含有酸性物质，使用时应戴手套和防护眼镜。

Buffer RET 含有离液盐，与漂白剂结合可能形成活性化合物。不要直接向废料中添加漂白剂或酸性溶液。

实验步骤

1、接种新鲜的 100 μL 菌液到 150 mL LB 培养基（含适量抗生素），37℃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 LB 培养基内，37℃，震荡（约 250 rpm）培养 6-8 h。OD600 介于 2.0-3.0 的高拷贝质粒的 150 mL 菌液。

注：请勿使用保存在 4℃的菌液作为初始菌液。

注：请勿使用过量菌液。

2、5,000 rpm 离心 10 min，弃上清，将管子倒置于纸巾上，去除残留培养基（尽量除干净）。

注：残留培养基会导致细胞裂解不良，从而降低 DNA 产量。

3、加入 **5 mL Buffer A1**（确保已经加入 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 **5 mL Buffer B1**，必须轻轻地反转 5-10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 5 min 左右，裂解液整体表现为粘稠状态。如有必要，期间可再颠倒混匀数次。

注：Buffer B1 若产生沉淀，须在 37℃加热，使沉淀溶解后再使用。静置时间不可过长，过长影响质粒提取。

5、加入 **1.5 mL Buffer N3**，立即手动震荡 5-10 次混匀，之前粘稠状态消失，产生白色沉淀。

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、清除裂解液沉淀有两种选择:

高速离心机：将裂解液移入高速离心管，室温 11000 rpm 离心 10 min。将清澈的裂解液转移到 50 mL 离心管中(避免漂浮沉淀物)。

ezFilter 注射器：将裂解液直接倒入 60 mL 过滤注射器筒内。将注射器插入放置在架子上的干净的 50 mL 离心管(自备)。让细胞裂解液静置 10 min。白色的沉淀物应该浮在上面。将过滤注射器筒置于 50 mL 离心管上，轻轻插入柱塞将已清除的溶出液排出至离心管，当感觉到较大阻力时停止，部分溶出液可能残留在絮凝沉淀中，不要强迫残留的溶出液通过过滤器。

注：该试剂盒不提供 ezFilter 注射器，如有需要可向 BEIWO 单独购买。

建议：可低速离心 1 min（5000 rpm 左右）后取相对澄清的上清液，或低速离心后再用 60 mL Filter syringe 过滤裂解液。

注：采用过滤器过滤上清液会有部分的损耗。

7、取步骤 6 中的上清液（大约 10 mL）转移至一个干净的 50 mL 离心管中（避免吸到沉淀），加入 **5 mL 的 Buffer RET** 和 5 mL 无水乙醇混匀，再加入 **800 μL Plasmid Beads**，涡旋混匀 1 min 左右。

注：Buffer RET 能够去除内毒素，同时会损失部分 DNA。

注：Plasmid Beads 使用前需充分涡旋混匀。

8、混匀后室温静置 10 min，期间需手动或涡旋混匀 3-5 次，之后上磁力架静置 2-3 min 左右（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。

注：孵育期间的混匀能够使磁珠更好地结合质粒。

9、从磁力架上取下离心管，加入 **9 mL Buffer KB**，涡旋混匀 1 min，之后上磁力架静置 1-2 min（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。

10、从磁力架上取下离心管，加入 **9 mL DNA Wash Buffer**(确保已经加入 96-100%乙

醇），涡旋混匀 1 min，之后上磁力架静置 1-2 min（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。

注：DNA Wash Buffer 使用前请加入瓶身相应的 96-100%乙醇。

11、从磁力架上取下离心管，加入 9 mL 无水乙醇，涡旋混匀 1 -2min，之后上磁力架静置 1 min（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。在磁力架上晾干 5-10 min。除残留乙醇，以便获得最佳洗脱。

注：要注意观察磁珠是否过于干燥，过于干燥会影响洗脱效果。

12、从磁力架上取下离心管，加入 **1-3 mL Endofree Elution Buffer**（65℃水浴锅预热）或者细胞培养水，涡旋混匀 1 min，65℃水浴锅孵育 5 min，期间混匀 2 次再上磁力架，静置 5 min 左右（确保所有磁珠被吸附即可），吸取澄清的液体（产物）至无菌离心管中，检测后于-20℃或-80℃保存。

注：洗脱体积小时，用 50 mL 离心管吸磁可能不方便。可将步骤中的磁珠及液体吹打混匀后转移至合适的离心管以及磁力架进行后续操作。如果离心管壁上有残留磁珠，可以再加入部分洗脱液漂洗，然后一并转移到离心管中。

注：适当延长吸磁时间或者离心，可以减少磁珠的残留情况。

注：如有必要可进行二次洗脱，可更完全的洗脱质粒，提高 DNA 产量。

如需匹配自动化平台，请联系技术支持，电话：400-115-2855。

24A 自动化提取 SOP

适配 Allsheng Auto-Pure 24A

1. 取 150 mL 菌液，按照前面的**步骤 3-6** 进行操作得到裂解液上清液。

2. 取 24 孔深孔板，按照下表 1 加入样本和试剂至板中。若为非预装版试剂盒，以下试剂都需自行加入。

注：每一孔的总体积不能超过 10000 μL，否则可能溢出。一个样本需分成两个孔。

表 1. 24 孔板设置

24 孔板编号	对应仪器板位	样本/试剂	体积(μL)	预分装版试剂盒说明	非预分装版试剂说明
banding	1	Buffer RET	2500	已分装，无需用户自行加入	先加入裂解液和 RET，再加入 100%无水乙醇混匀。
		预处理混合液	< 5000	客户需自行加入	
		100%无水乙醇	2500	客户需自行加入	
Beadsi	3	Beads	400	已分装，无需用户自行加入	注：Beads 在使用前需涡旋混匀 1min，充分混匀磁珠，以确保加入各孔无差异。
Wash 1	4	Buffer KB	5000	已分装，无需用户自行加入	
Wash 2	5	DNA Wash Buffer	5000	已分装，无需用户自行加入	首次使用 DNA Wash Buffer 时，需加入瓶身上对应的无水乙醇。
Wash 3	6	100%无水乙醇	5000	客户需自行加入	
		磁棒套	/	磁棒套必须放平稳。	磁棒套必须放平稳。
Elute	8	Endofree Elution Buffer	1000	已分装，无需用户自行加入	洗脱体积可根据具体要求调整。至少加入 700μL Elution Buffer 进行洗脱。

注：预装版的 Endofree Elution Buffer 只有 1mL/孔，如果想加大洗脱体积，则需另外购买。

1. 启动仪器，在仪器中放置好新的洁净磁棒套，并将装有样品和试剂的 24 孔板安放至仪器中对应的板位上。
2. 执行程序请参考表 2。（该程序设定仅供参考）
3. 待程序完成后收集产物：取出 24 孔板，吸取 Elute 板（8 号位）内的提取产物至无菌离心管中，检测后于-20℃或-80℃保存。

表 2. 提取程序

步骤	名称	板位	混合时间(min)	混合幅度(%)	等待时间(min)	容积(uL)	混合速度(1-10)	温度(℃)	吸磁段数(0-5)	循环次数(1-10)	吸磁速度(1-10)	第一段吸磁时间(s)	第二段吸磁时间(s)	第三段吸磁时间(s)	第四段吸磁时间(s)	第五段吸磁时间(s)	液面停留(0-30s)

1	Load	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Mix	1	0.2	80	0	9000	5	OFF	0	1							
3	Beads	3	0	80	0	400	5	OFF	1	1	1	20					
4	Binding	1	5	80	0	5000	8	OFF	5	1	1	1	1	1	1	1	0
5	Wash1	4	1	80	0	5000	8	OFF	2	1	1	1	1	-	-	-	0
6	Wash2	5	1	80	0	5000	8	OFF	2	1	1	1	1	-	-	-	0
7	Wash3	6	1	80	2.0	5000	8	OFF	2	1	1	1	1	-	-	-	0
8	Elute	8	5	80	0	1000	2	70	2	4	1	40	30	-	-	-	0
9	Unload	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：1、设置为先升温后动作；降温风扇关闭，降温动作同步。

2、若客户改变了洗脱体积则需要改动相应步骤 8 的程序参数，例：洗脱体积 2000 ul，混合速度 4。

3、若对本实验还有疑问请联系技术支持，电话：400-115-2855。

购买须知

根据说明书使用时，本产品应按其标签和倍沃的文献中所述执行。倍沃不提供任何其他类型的明示或暗示，包括但不限于适销性或适合某一特定目的的保证。在选择倍沃时，违反本保证的，倍沃唯一的义务和买方的唯一补救措施是更换产品，倍沃应当没有任何直接或间接的，或使用引起的附带损害，或无法使用它产品的责任。如需技术支持或了解更多产品信息，请致电与我们联系，或访问我们的网站

全国服务热线：400-115-2855

技术邮箱：tech@beiwobiomedical.com

市场邮箱：market@beiwobiomedical.com

倍沃官网：www.beiwobiomedical.com

附录

表 1. 24 通道预装版试剂盒规格及型号目录表

Catalog#	BW-MPD1520-A24-10	BW-MPD1520-A24-11	BW-MPD1520-A24-12	BW-MPD1520-A24-13
Preps	24 x 1	24 x 4	24 x 10	24 x 20
24 孔磁棒套*	2	8	20	40
Plasmid beads	400 uL	400 uL	400 uL	400 uL
Buffer A1	125 mL	485 mL	3 x410 mL	5 x485mL
Buffer B1	125 mL	485 mL	3 x410 mL	5 x485 mL
Buffer N3	40 mL	150 mL	365 mL	2 x 365 mL
Buffer RET	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Buffer KB	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
DNA Wash Buffer	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
RNase A (20 mg/mL)	1.3 mL	5 mL	13 mL	25 mL
Endofree Elution Buffer	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
User Manual	1	1	1	1

*24 孔磁棒套包装中附有一块 24 孔深孔板。

注：Buffer A1、Buffer B1、Buffer N3 和 RNase A 为瓶装试剂总剂量，其余上述试剂均为单孔试剂量。

24 次的试剂盒包括：Buffer RET 板 x 2；Buffer KB x 2；DNA Wash Buffer x 2；Endofree Elution Buffer x 2；Plasmid beads x 2；空白板 x 2；24 孔磁棒套 x 2。

www.beiwobiomedical.com

扫码了解更多

杭州总部
地址：浙江省杭州市余杭区余杭塘路 2636 号 1 幢 101 室
电话：0571-56391588　　传真：0571-56390383
电子邮箱：market@beiwobiomedical.com

美国
地址：美国加利福尼亚州圣地亚哥市罗赛尔大街 10637 号 C 单元
电话：1-858-597-0602　　传真：1-858-538-1698
电子邮箱：info@biomiga.com