Ver: 2012

无内毒素质粒小提试剂盒 II（磁珠法）

（BW-MPD1222）

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
20A 自动化提取 SOP 5
32A 自动化提取 SOP 7
96A 自动化提取 SOP 9
24A 自动化提取 SOP 11
购买须知 13

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-MPD1222-A00-00	BW-MPD1222-A00-01	BW-MPD1222-A00-02
Preps	50	250	1000
Plasmid-L Beads	3.7 mL	17.7 mL	70.5 mL
Buffer A1	30 mL	130 mL	2 x 255 mL
Buffer B1	30 mL	130 mL	2 x 255 mL
Buffer N3	10 mL	40 mL	160 mL
Buffer RET	30 mL	130 mL	2 x 225 mL
Buffer KB	55 mL	255 mL	2x 500 mL
DNA Wash Buffer*	24 mL	2 x54 mL	4 x 100 mL
Endofree Elution Buffer	20 mL	80 mL	310 mL
RNase A (20 mg/mL)	150 µL	750 µL	2 x1.5 mL
User Manual	1	1	1

* DNA Wash Buffer：使用前请将 96 mL (BW-MPD1222-A00-00)或 216 mL (BW-MPD1222-A00-01)或 400 mL (BW-MPD1222-A00-02) 96-100%乙醇加入至每个 DNA Wash Buffer 瓶内。

产品简介

该试剂盒是采用磁珠与质粒 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<10 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。

本试剂盒用于快速高效提取< 15 mL 菌液的质粒 DNA，最高产量可达到 60 µg。本产品可匹配多种自动化核酸提取仪，如 Allsheng Auto-Pure 20A。

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-L Beads 可常温运输，长期保存于 4℃。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：20 mg/mL，使用前需将提供的所有 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。
- Plasmid-L 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
- 磁力架或自动化仪器
- 15 ml 和 1.5 mL 高速离心管

安全信息

Buffer N3和Buffer KB中含有离液盐，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. 接种新鲜的菌液到 5-15mL　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。

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 **500 μL Buffer A1**（确保其中已加入 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 **500 μL 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 以内，裂解液整体表现为澄清。

注：孵育时间不能超过 5min。Buffer B1 若产生沉淀，须在 37℃加热，使沉淀溶解后再使用。

5. 加入 **150 μL Buffer N3**，立即手动震荡 5-10 次混匀，产生白色沉淀。

注：一定要混合均匀，若混合物仍然呈团块、褐色、粘稠状，需要更充分混匀来完全中和。

6. 将裂解液移入高速离心管，室温 12000 rpm 离心 10 min。

注：若沉淀离心不完全，可以再离心 5min；若没有高速离心机，可低速离心（5000 rpm 左右） 后取相对澄清的上清液。

7. 取步骤 6 中的上清液转移至一个干净的 15 mL 离心管中（避免吸到沉淀），加入 **500 μL Buffer RET** 和 500μL 无水乙醇，混匀得到裂解液混合液。

8. 加入 **70 μL Plasmid-L Beads**，涡旋混匀 1 min 左右。室温静置 10 min，期间需手动或涡旋混匀 3-5 次。孵育结束后将离心管置于磁力架上静置 2-3min 左右（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。

注：Plasmid-L Beads 使用前需充分涡旋混匀。

注：孵育期间一直混匀有助于提高得率。

注：若管上有磁珠残留，可以进行瞬时离心后上磁力架或者保持离心管在磁力架上，整体上下颠倒 2-3 次，使磁珠完全吸附。

9. 从磁力架上取下离心管，加入 **1 mL Buffer KB**，涡旋混匀 1 min。

注：此步骤可先加入 **500 μL Buffer KB**，将所有磁珠及液体转移至 1.5 mL 离心管中。再加入 **500 μL Buffer KB** 洗涤离心管壁上的残留磁珠，然后一并转移到 1.5 ml 离心管中。

10. 将离心管置于磁力架上，静置 1 min（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠，取下离心管。

11. 加入 **1 mL DNA Wash Buffer**（确保加入 96-100%乙醇），涡旋混匀 1 min，结束后将离心管置于磁力架静置 1 min（确保所有磁珠被吸附即可），弃去上清液，保留磁珠。**重复此步骤**。

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

12. 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。

13. 从磁力架上取下离心管，加入 **150-300 μL Endofree Elution Buffer** 或者细胞培养水，涡旋混匀 1 min，室温孵育 5 min，期间混匀 1-2 次再上磁力架，静置 3-5 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：加入洗脱液后 65℃孵育 5min，或者进行二次洗脱，提高 DNA 产量。

注：为减少磁珠残留，可适当延长吸磁时间，或将取出的产物再放置于磁力加上 2-3 min，进行吸磁，也可通过离心处理。

注：吸取产物时，可少吸取 5-10 μL，以避免将磁珠吸出。

如需匹配自动化平台，请联系倍沃技术支持，电话：400-115-2855。

20A 自动化提取 SOP

适配 Allsheng Auto-Pure 20A

1. 取 5-15 mL 菌液，按照前面的**步骤 3-6** 进行操作得到裂解液混合液。

2. 取 96 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：孔 1 的总体积不能超过 5000 μL，其余孔位的总体积不能超过 1000 μL，否则可能溢出。一个样本一个孔。

表 1. 7 连孔板设置

孔板每列名称	对应孔位	样本/试剂	体积(μL)	预分装版试剂盒说明	非预装版试剂说明
Banding	孔 1	上清液	全部	尽量取澄清的裂解液；再加入 100%无水乙醇。	依次加入 RET、澄清的裂解液和 100%无水乙醇混匀。
		100%无水乙醇	500		
		Buffer RET	500	已分装，无需用户自行加入	
Beads	孔 2	Plasmid-L Beads	35	已分装，无需用户自行加入	注：Beads 在使用前需涡旋混匀 1 min，充分混匀磁珠，以确保加入各孔无差异
		磁珠保存液(或 ddH_2O)	65	已分装，无需用户自行加入	
Wash 1	孔 3	Buffer KB	1000	已分装，无需用户自行加入	/
Wash 2	孔 4	DNA Wash Buffer	1000	已分装，无需用户自行加入	首次使用需加入瓶身上对应的无水乙醇
Wash 3	孔 5	DNA Wash Buffer	1000	已分装，无需用户自行加入	首次使用需加入瓶身上对应的无水乙醇
Elution	孔 7	Endofree Elution Bufferr	200	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 60 μL Elution Buffer 进行洗脱。

3. 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 7 连板安放至仪器中对应的板位上。

4. 执行程序请参考表 2。（该程序设定仅供参考）

5. 待程序完成后收集产物：取出 7 连孔板，吸取 Elute 板（孔 7）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	孔位	混合时间 (min)	吸磁时间 (s)	等待时间 (min)	容积 (μL)	混合速度 (1-10)	温度 (℃)	混合位置 (0-100%)	混合幅度 (1-100%)	吸磁位置 (0-100%)	吸磁速度 (1-10)
1	Mix	1	0.2	-	-	2000	7	OFF		80		
2	Beads	2	0	60	0	100	-	OFF	0	80	0	1
3	Banding	1	5	300	0	2000	7	OFF	0	80	0	1
4	Wash1	3	0.5	120	0	1000	4	OFF	0	80	0	1
5	Wash2	4	0.5	120	0	1000	4	OFF	0	80	0	1
6	Wash3	5	0.5	120	1	1000	4	OFF	0	80	0	1
7	Elute	7	5	180	0	200	6	65	0	80	0	1
8	Drop	2	0.5			100	5	OFF		80		

注：1、设置升温动作同步；降温风扇关闭，降温动作同步。往复吸磁。

2、若对本实验还有疑问请联系倍沃技术支持，*电话：400-115-2855*。

32A 自动化提取 SOP

适配 Allsheng Auto-Pure 32A

1. 取 5-15 mL 菌液，按照前面的**步骤 3-7** 进行操作得到裂解液混合液。

2. 取 96 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 1000 μL，否则可能溢出。一个样本需分成两个孔。

表 1. 96 孔板设置

孔板每列名称	对应仪器板位	样本/试剂	体积(μL)	预分装版试剂盒说明	非预装版试剂说明
Banding	1/7 列	预处理混合液	<1000	需用户自行加入	依次加入 RET、澄清的裂解液和100%无水乙醇混匀。
Beads	2/8 列	Plasmid-L Beads	35	已分装，无需用户自行加入	注：Beads 在使用前需涡旋混匀 1 min，充分混匀磁珠，以确保加入各孔无差异
		磁珠保存液(或 ddH_2O)	65	已分装，无需用户自行加入	
Wash 1	3/9 列	Buffer KB	500	已分装，无需用户自行加入	/
Wash 2	4/10 列	DNA Wash Buffer	600	已分装，无需用户自行加入	首次使用需加入瓶身上对应的无水乙醇
Wash 3	5/11 列	DNA Wash Buffer	600	已分装，无需用户自行加入	首次使用需加入瓶身上对应的无水乙醇
Elution	6/12 列	Endofree Elution Bufferr	100	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 60 μL Elution Buffer 进行洗脱。

3. 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 96 孔板安放至仪器中对应的板位上。

4. 执行程序请参考表 2。（该程序设定仅供参考）

5. 待程序完成后收集产物：取出 96 孔板，吸取 Elute 板（6/12 列）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	孔位	混合时间 (min)	吸磁时间 (s)	等待时间 (min)	容积 (μL)	混合速度 (1-10)	温度 (℃)	混合位置 (0-100%)	混合幅度 (1-100%)	吸磁位置 (0-100%)	吸磁速度 (1-10)
1	Mix	1	0.2	-	-	900	5	OFF		80		
2	Beads	2	0	10	0	100	-	OFF	0	80	0	1
3	Banding	1	5	60	0	900	4	OFF	0	80	0	1
4	Wash1	3	1	30	0	500	7	OFF	0	80	0	1
5	Wash2	4	1	30	0	600	7	OFF	0	80	0	1
6	Wash3	5	1	30	0.5	600	7	OFF	0	80	0	1
7	Elute	6	5	60	0	100	6	65	0	80	0	1
8	Drop	5	0.5			600	5	OFF		80		

注：1、设置升温动作同步；降温风扇关闭，降温动作同步。

2、若对本实验还有疑问请联系倍沃技术支持，*电话：400-115-2855*。

96A 自动化提取 SOP

适配 Allsheng Auto-Pure 96A

1. 取 5-15 mL 菌液，按照前面的**步骤 3-7** 进行操作得到裂解液混合液。

2. 取 96 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 1000 μL，否则可能溢出。一个样本需分成两个孔。

表 1. 96 孔板设置

96 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	试剂说明
Banding	1	裂解液混合液	<1000	需用户自行加入	依次加入 RET、澄清的裂解液和 100%无水乙醇混匀。
Beads	3	Plasmid-L Beads	35	已分装，无需用户自行加入	注：Beads 在使用前需涡旋混匀 1 min，充分混匀磁珠，以确保加入各孔无差异
		磁珠保存液(或 ddH_2O)	65		
		磁棒套	/	/	
Wash 1	4	Buffer KB	500	已分装，无需用户自行加入	/
Wash 2	5	DNA Wash Buffer	600	已分装，无需用户自行加入	首次使用需加入瓶身上对应的无水乙醇
Wash 3	6	DNA Wash Buffer	600	已分装，无需用户自行加入	首次使用需加入瓶身上对应的无水乙醇
Elute	8	Endofree Elution Buffer	100		洗脱体积可根据具体要求调整。

3. 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 96 孔板安放至仪器中对应的板位上。

4. 执行程序请参考表 2。（该程序设定仅供参考）

5. 待程序完成后收集产物：取出 96 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(μL)	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	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Beads	3	0	80	0	100	-	OFF	1	2	1	20	-	-	-	-	0
3	Banding	1	5	80	0	1000	3	OFF	3	2	1	15	15	15	-	-	0
4	Wash1	4	0.5	80	0	500	4	OFF	3	2	1	10	10	15	-	-	0
5	Wash2	5	0.5	80	0	600	5	OFF	3	2	1	10	10	15	-	-	0
6	Wash3	6	0.5	80	7	600	5	OFF	3	2	1	10	10	15	-	-	0
7	Elute	8	5	80	0	100	3	65	4	2	1	30	30	30	30	-	30
8	Drop	6	0.2			600	6										
9	Unload	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：1、设置升温动作同步；降温风扇关闭，降温动作同步。

2、若对本实验还有疑问请联系倍沃技术支持，*电话：400-115-2855*。

24A 自动化提取 SOP

适配 Allsheng Auto-Pure 24A

1. 取 5-15 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。

表 1. 孔板设置

孔板编号	对应仪器板位	样本/试剂	体积(μL)	预装版说明	非预分装版试剂说明
Bandin g	1	裂解液上清液	全部	尽量取澄清的裂解液；再加入 100%无水乙醇。	依次加入 RET、澄清的裂解液裂解液和 100%无水乙醇混匀。
		100%无水乙醇	500		
		Buffer RET	500	已分装，无需用户自行加入	
Beads	3	Plasmid-L Beads	70	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。
		磁珠保存液(或 ddH_2O)	30		
		磁棒套	/	/	磁棒套必须放平稳。
Wash 1	4	Buffer KB	1000	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 2	5	DNA Wash Buffer	1000	已分装，无需用户自行加入	
Wash 3	6	DNA Wash Buffer	1000	已分装，无需用户自行加入	
Elute	8	Endofree Elution Buffer	200	已分装，无需用户自行加入	洗脱体积可根据具体要求调整。

3. 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。

4. 执行程序请参考表 2。（该程序设定仅供参考）

5. 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. 自动化程序设定

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	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Mix	1	0.2	80	0	1000	3	OFF	0								
3	Beads	3	0	80	0	100	5	OFF	1	2	1	20					
4	Binding	1	5	80	0	1000	2	OFF	3	2	1	10	15	10	-	-	0
5	Wash1	4	0.5	80	0	1000	2	OFF	3	2	1	10	10	10	-	-	0
6	Wash2	5	0.5	80	0	1000	2	OFF	3	2	1	10	10	10	-	-	0
7	Wash3	6	0.5	80	4.0	1000	2	OFF	3	2	1	10	10	10	-	-	0
8	Elute	8	5	80	0	150	1	65	1	3	1	30	-	-	-	-	30
9	Drop	6	0.2	-	-	1000	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	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、若对本实验还有疑问请联系技术支持，再进行实验。

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

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