Ver: 2310

无内毒素质粒小提试剂盒（磁珠法）

（BW-MPD1220）

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

32A 自动化提取 SOP 5

96A 自动化提取 SOP 7

购买须知 9

杭州倍沃医学科技有限公司

产品组成

Catalog#	BW-MPD1220-A00-00	BW-MPD1220-A00-01	BW-MPD1220-A00-02
Preps	50	250	1000
Plasmid-L Beads	2 x 900 µL	8.8 mL	35.5 mL
Buffer A1	15 mL	65 mL	255 mL
Buffer B1	15 mL	65 mL	255 mL
Buffer N3	5 mL	20 mL	80 mL
Buffer KB	30 mL	130 mL	500 mL
Buffer RET	15 mL	65 mL	255 mL
DNA Wash Buffer*	15 mL	2 x 40 mL	3 x 100 mL
RNase A (20 mg/mL)	120 µL	520 µL	2 x1.1 mL
EndoFree Elution Buffer	10 mL	50 mL	200 mL
User Manual	1	1	1

* DNA Wash Buffer：使用前请将 60 mL(BW-MPD1220-A00-00) or 160 mL(BW-MPD1220-A00-01) or 400 mL(BW-MPD1220-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 1~5 mL 菌液的质粒 DNA，最高产量可达到 50 µg。本产品可匹配多种自动化核酸提取仪，如 Allsheng Auto-Pure 32A/96A。

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

杭州倍沃医学科技有限公司

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
- 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 1~5mL　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. 12,000 rpm 离心 1 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 **250 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 **250 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。

杭州倍沃医学科技有限公司

5. 加入 **75μL 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 **250 μL Buffer RET** 和 250μL 无水乙醇，混匀得到裂解液混合液。

8. 加入 **35 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 **500 μL 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 **500 μL 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 **50-100 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。

杭州倍沃医学科技有限公司

32A 自动化提取 SOP

适配 Allsheng Auto-Pure 32A

1. 取 1~5 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。

杭州信沃医学科技有限公司

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*。

杭州倍沃医学科技有限公司

96A 自动化提取 SOP

适配 Allsheng Auto-Pure 96A

1. 取 1~5 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。

杭州信天医学科技有限公司

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*。

杭州倍沃医学科技有限公司

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 400-115-2855 与我们联系，或访问我们的网站

www.biomiga.com.cn

杭州倍沃医学科技有限公司