倍沃医学

Ver: 260701

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

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	15 mL	65 mL	255 mL
PKB-1	50 mL	255 mL	1000 mL
Buffer LER	4 mL	20 mL	80 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。Buffer LER 收到货后应存放于 4℃，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
- 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。

5. 加入 **250 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 13000 rpm 离心 5 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（约 700 μL 上清，避免吸到沉淀），加入 **70 μL Buffer LER** 和 **300 μL 异丙醇**，混匀得到混合液。

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 **1 mL Buffer PKB-1**，涡旋混匀 1 min。

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** 或者超纯水（65℃预热），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。

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	依次加入澄清的裂解液、Buffer LER 和异丙醇混匀（参考手提步骤）。
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	PKB-1	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 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	依次加入澄清的裂解液、Buffer LER 和异丙醇混匀（参考手提步骤）。
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	PKB	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*。

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.beiwobiomedical.com