

MolPure[®] Magnetic Endo-free Plasmid med Kit

磁珠法去内毒素质粒中量提取试剂盒

产品简介

MolPure[®] Magnetic Endo-free Plasmid med Kit 适用于从 5~20 mL 细菌培养液中提取高达 90 µg 的去内毒素质粒 DNA，该方法采用超顺磁性的磁性粒子和特殊的内毒素去除液分离纯化去内毒素质粒 DNA，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿试剂，操作简单方便，纯化的质粒可直接用于酶切、PCR、一代测序和细胞转染等相关实验。

产品信息

货号	18543ES24/18543ES48
规格	24 T/48 T

组分信息

类别	组分编号	组分名称	18543ES24	18543ES48
Part I	18543-A	RNase A	125 µL/支×1	250 µL/支×1
Part II	18543-B	磁珠悬浮液	1 mL/支×1	1 mL/支×2
	18543-C	Buffer P1	12.5 mL/瓶×1	25 mL/瓶×1
	18543-D	Buffer P2	12.5 mL/瓶×1	25 mL/瓶×1
	18543-E	Buffer P3	12.5 mL/瓶×1	25 mL/瓶×1
	18543-F	内毒素去除液	4 mL/瓶×1	4 mL/瓶×2
	18543-G	结合液	18 mL/瓶×1	36 mL/瓶×1
	18543-H	Wash Buffer A	20 mL/瓶×1	40 mL/瓶×1
	18543-I	Wash Buffer B	11 mL/瓶×1	18 mL/瓶×1
	18543-J	洗脱液	5 mL/瓶×1	10 mL/瓶×1

储存条件

- 1.Part I - 25~-15°C 保存，有效期 18 个月；
- 2.Part II 室温保存，有效期 18 个月。

注意事项：

1. Buffer P2 和 Buffer P3 中含有刺激性物质，操作过程中应穿上实验服，戴好乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，防止吸入口鼻。沾染皮肤或眼睛后，请立即用清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医生的帮助。
2. 本产品仅作科研用途！

实验前准备：

1. 自备仪器与试剂：台式离心机、磁力架、金属浴、小型离心机、涡旋振荡仪、核酸提取仪、无水乙醇。
2. 首次使用前，将 RNase A (18543-A)全部加入到 Buffer P1 (18543-C) 瓶中，充分混匀后使用，并做好标记，储存于 2-8°C。

- 按瓶身标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Wash Buffer B (18543-I)，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。18543ES24 中，Wash Buffer B (18543-I) 每瓶需加入 44 mL 无水乙醇；18543ES48 中，Wash Buffer B (18543-I) 每瓶需加入 72 mL 无水乙醇。
- 使用前请检查 Buffer P2 和 Wash Buffer A 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请于 37°C 水浴重新溶解。

操作方法

一、手动单管提取

样本预处理：

- 从新鲜培养的平板中挑取一个单克隆菌落，接种到含对应抗生素的 LB 培养基中，37°C 剧烈振荡培养 12-16 h。
【注】：细菌培养时间不应超过 16 h。培养时间超过 16 h 的细菌开始出现溶解现象，可能导致质粒 DNA 的得率降低。
【注】：用于细菌培养的培养基所占容器的体积不应大于 1/4。
【注】：长时间储存的甘油菌中的细菌可能已经出现细菌个体间基因型的分化，并混有丢失质粒的细菌。甘油菌必须在含有抗生素的平板上划线筛选，挑选生长良好的单菌落用于接种培养。
- 取 5-20 mL 过夜培养的菌液到合适的离心管中，12,000 rpm 离心 2 min，吸弃上清液，倒扣离心管在吸水纸上吸干残液，收集菌体沉淀。
- 加入 500 μ L Buffer P1，高速涡旋重悬菌体沉淀，将菌体沉淀重悬液转移至 2 mL 离心管中。
【注】：务必确保菌体彻底重悬，否则影响得率和质量。
【注】：确保 Buffer P1 中已添加 RNase A。
- 加入 500 μ L Buffer P2，立即温和地上下翻转 10-20 次以充分裂解菌体，室温放置 3-4 min。
【注】：使用 Buffer P2 前确认溶液中没有沉淀存在；Buffer P2 使用后应盖紧瓶盖，避免与空气长期接触。
【注】：裂解时间与菌量相关，当细菌裂解充分时，溶液应呈粘稠的透明状；如果达不到上述效果，可能是细菌用量过多所致，可增加翻转的次数以达到粘稠的透明状，此步骤最长不能超过 5 min。
【注】：此步骤不可用旋涡振荡器混匀，否则将导致最后制备的质粒中混有基因组 DNA。
- 加入 500 μ L Buffer P3，立即温和地上下翻转 10-20 次充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 室温离心 10 min。
【注】：加入 Buffer P3 后应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。菌量较多时，可稍加用力颠倒数次至溶液彻底中和，中和后沉淀应为白色。
- 转移上清至新的离心管中，加入 1/10 体积的内毒素去除液（如 700 μ L 上清加入 70 μ L 内毒素去除液）。颠倒混匀后置于 4°C 冰箱冷藏 10 min，取出后 42°C 温浴 10 min。
- 12,000 rpm 离心 3 min，取上层清液到新的离心管中，即得到**样本处理液**。
【注】：去内毒素后得到的质粒内毒素含量约 0.1~2.5 EU/ μ g。
【注】：此步离心后可观察到离心管内液体明显分层，小心吸取全部上层液体，注意不要吸到下层绿色液体。此步骤最少可吸出 1200 μ L 上清液，可根据自身实验条件吸取大于 1200 μ L 的部分。
- 转移**样本处理液**至新的 15 mL 离心管中，加入 0.5 倍体积的结合液和 40 μ L 磁珠悬浮液，振荡混匀 7 min。
【注】：磁珠悬浮液使用前需充分涡旋混匀，保证磁珠彻底重悬，每加样几次后需充分摇匀后继续加样。
- 将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，吸弃上清。
- 加入 800 μ L Wash Buffer A，振荡混匀 2 min，将全部液体转移到新的 1.5 mL 离心管中，短暂离心，将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，吸弃上清。
- 加入 800 μ L Wash Buffer B（确保已加入无水乙醇），振荡混匀 2 min，短暂离心，将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，吸弃上清。

12. 加入 800 μL Wash Buffer B (确保已加入无水乙醇)，振荡混匀 2 min，短暂离心，将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，吸弃上清。
13. 再次离心后，将离心管置于磁力架上静置，待磁珠完全吸附，尽量吸弃所有液体。
14. 将离心管敞口放置 5~10 min，使无水乙醇挥发干净。
15. 将离心管从磁力架上取下，加入 100 μL 洗脱液，涡旋混匀。短暂离心，65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min，期间可涡旋混匀以提高洗脱效率。短暂离心后，将离心管置于磁力架上静置，待磁珠完全吸附，小心吸取上清到新的离心管中，即得到纯的质粒 DNA。注意不要吸到磁珠，否则影响质粒纯度。

二、适配翌圣 16/48 通道核酸提取仪

1. 按照“一、手动单管提取”部分处理菌体沉淀（第 1-7 步），得到待用的**样本处理液**。
2. 按照下表向 96 孔深孔板中加入相应试剂：

孔位	试剂名称	用量/孔
1/7 列	样本处理液	全部样本处理液的 1/2 体积
	结合液	该列样本处理液的 1/2 体积 (如 600 μL 样本处理液，则加 300 μL 结合液)
	磁珠悬浮液	20 μL
2/8 列	样本处理液	全部样本处理液的剩余 1/2 体积
	结合液	该列样本处理液的 1/2 体积 (如 600 μL 样本处理液，则加 300 μL 结合液)
	磁珠悬浮液	20 μL
3/9 列	Wash Buffer A	800 μL
4/10 列	Wash Buffer B (已加无水乙醇)	800 μL
5/11 列	洗脱液	100 μL
6/12 列	Wash Buffer B (已加无水乙醇)	800 μL

【注】：由于 96 孔深孔板体积限制，样本处理液需采用两孔结合方式平均分配在第 1/7 列和 2/8 列，单孔结合液体积是样本处理液体积的 1/2 (如第 1 列样本处理液体积为 600 μL ，则第 1 列结合液体积为 300 μL)。

【注】：磁珠悬浮液使用前需充分涡旋混匀，保证磁珠彻底重悬，每加样几次后需充分摇匀后继续加样。

3. 按照提取仪的位置，正确安装 96 孔深孔板，并放置 8 联磁棒套。
4. 运行如下程序，程序结束后，将洗脱得到的核酸溶液（第 5/11 列）转移至新的离心管中，溶液可置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存，-80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

翌圣 16 通道自动化核酸提取仪 AP-16S 提取程序

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步	第 8 步
工位	1	3	2	3	4	6	5	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:04:00	00:00:00
混合模式	M3	M3	M3	M3	M2	M2	M3	M2
混合时间	00:05:00	00:00:15	00:05:00	00:02:00	00:01:30	00:01:00	00:06:00	00:00:15
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否

吸磁时间	00:01:20	00:00:00	00:01:20	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:20	00:00:00
体积	1000 μL	800 μL	1000 μL	800 μL	800 μL	800 μL	100 μL	800 μL
温度	-	-	-	-	-	-	65 $^{\circ}\text{C}$	-

翌圣 48 通道自动化核酸提取仪 AP48 提取程序

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步	第 8 步
工位	1	3	2	3	4	6	5	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:04:00	00:00:00
混合模式	M3	M3	M3	M3	M2	M2	M3	M2
混合时间	00:05:00	00:00:15	00:05:00	00:02:00	00:01:30	00:01:00	00:06:00	00:00:15
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:20	00:00:00	00:01:20	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:20	00:00:00
体积	1000 μL	800 μL	1000 μL	800 μL	800 μL	800 μL	100 μL	800 μL
温度	-	-	-	-	-	-	65 $^{\circ}\text{C}$	-
混合模式	M2	混合时间 10 s, 混合速度 200000						
混合模式	M3	混合时间 10 s, 混合速度 300000						

三、适配翌圣 96 通道核酸提取仪

- 按照“一、手动单管提取”部分处理菌体沉淀（第 1-7 步），得到待用的**样本处理液**。
- 按照下表向 96 孔深孔板中加入相应试剂：

孔位	试剂名称	用量/孔
板位 1	样本处理液	全部样本处理液的 1/2 体积
	结合液	该列样本处理液的 1/2 体积 (如 600 μL 样本处理液, 则加 300 μL 结合液)
	磁珠悬浮液	20 μL
板位 2	样本处理液	全部样本处理液的剩余 1/2 体积
	结合液	该列样本处理液的 1/2 体积 (如 600 μL 样本处理液, 则加 300 μL 结合液)
	磁珠悬浮液	20 μL
板位 3	Wash Buffer A	800 μL
板位 4	Wash Buffer B (已加无水乙醇)	800 μL
板位 5	Wash Buffer B (已加无水乙醇)	800 μL
板位 6	洗脱液	100 μL

【注】：由于 96 孔深孔板体积限制，样本处理液需采用两孔结合方式平均分配在第 1/7 列和 2/8 列，单孔结合液体积是样本处理液体积的 1/2 (如第 1 列样本处理液体积为 600 μL ，则第 1 列结合液体积为 300 μL)。

【注】：磁珠悬浮液使用前需充分涡旋混匀，保证磁珠彻底重悬，每加样几次后需充分摇匀后继续加样。

- 按照提取仪的位置，正确安装 96 孔深孔板，并放置磁棒套。

4. 运行如下程序，程序结束后，将洗脱得到的核酸溶液（板位 6）转移至新的离心管中，溶液可置于-20℃短期保存，-80℃长期保存。

翌圣 96 通道自动化核酸提取仪 AP-96N 提取程序

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步	第 8 步
工位	1	3	2	3	4	5	6	4
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:04:00	00:00:00
混合模式	M3	M3	M3	M3	M2	M2	M3	M2
混合时间	00:05:00	00:00:15	00:05:00	00:02:00	00:01:30	00:01:00	00:06:00	00:00:15
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:20	00:00:00	00:01:20	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:20	00:00:00
体积	1000 μL	800 μL	1000 μL	800 μL	800 μL	800 μL	100 μL	800 μL
温度	-	-	-	-	-	-	65 °C	-
混合模式	M2	混合时间 10 s, 混合速度 200000						
混合模式	M3	混合时间 10 s, 混合速度 300000						