

MolPure[®] Magnetic Plasmid Mini Kit

磁珠法质粒小量提取试剂盒

产品简介

MolPure[®] Magnetic Plasmid Mini Kit 采用碱裂解法裂解细胞，通过独特的磁珠和精心优化的缓冲体系从菌体中提取纯化高质量的质粒 DNA，提取过程中不需要用到有毒的酚氯仿等有机物。本试剂盒适用于提取 1-5 mL 过夜培养的大肠杆菌，质粒提取得率和质量与质粒拷贝数、宿主菌种类以及细菌培养条件等因素相关。从 2 mL 过夜培养的菌液中一般能够获得 8-12 µg 的高质量质粒 DNA。本试剂盒提取到的质粒 DNA 可直接用于后续酶切、转化和测序等实验。

产品信息

货号	18538ES50/18538ES70
规格	50 T/200 T

组分信息

类别	组分编号	组分名称	18538ES50	18538ES70
Part I	18538-A	RNase A	125 µL	500 µL
Part II	18538-B	磁珠悬浮液	1 mL × 1 支	1 mL × 4 支
	18538-C	Buffer P1	12.5 mL	50 mL
	18538-D	Buffer P2	12.5 mL	50 mL
	18538-E	Buffer P3	12.5 mL	50 mL
	18538-F	Wash Buffer A	25 mL	100 mL
	18538-G	Wash Buffer B	12 mL	50 mL
	18538-H	Wash Buffer C	10 mL	40 mL
	18538-I	洗脱液	5 mL	25 mL

储存条件

- 1.Part I 冰袋运输，-25~-15°C 保存，有效期 2 年；
- 2.Part II 室温运输，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. 洗脱时可能存在磁珠残留，吸取样本时应尽量避免吸入磁珠。
3. 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、异丙醇、无水乙醇。
2. 首次使用前，将 RNase A (18538-A)全部加入到 Buffer P1 (18538-C) 瓶中，充分混匀后使用，并做好标记，储存于 2-8°C。

3. 按瓶身标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Wash Buffer B (18538-G)，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。18538ES50 中，Wash Buffer B (18538-G) 每瓶需加入 48 mL 无水乙醇；18538ES70 中，Wash Buffer B (18538-G) 每瓶需加入 200 mL 无水乙醇。

4. 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：

1. 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。

2. 取 1-5 mL 过夜培养的菌液，12,000 rpm 离心 1 min，吸弃上清液，收集菌体沉淀。

【注】：菌液较多时，可通过多次离心将菌体沉淀收集在一个离心管中。

3. 向菌体沉淀中加入 250 μ L Buffer P1，吹打或涡旋重悬菌体沉淀。

【注】：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。

4. 加入 250 μ L Buffer P2，立即温和地上下翻转 6-8 次以充分裂解菌体。

【注】：使用 Buffer P2 前确认溶液中没有沉淀存在；Buffer P2 使用完后应盖紧瓶盖，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。

5. 加入 250 μ L Buffer P3，立即温和地上下翻转 6-8 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，小心地吸取 700 μ L 上清液至新的 1.5 mL 离心管中。

6. 向上述 700 μ L 上清液中加入 300 μ L 异丙醇和 20 μ L 磁珠悬浮液，振荡混匀 5 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。

7. 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。

8. 加入 500 μ L Wash Buffer A，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。

9. 加入 500 μ L Wash Buffer B（确保已加入无水乙醇），振荡混匀 1.5 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。

10. 加入 500 μ L Wash Buffer B（确保已加入无水乙醇），振荡混匀 1 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。

11. 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。

12. 将离心管敞口放置 5 min，使无水乙醇挥发干净。

13. 将离心管从磁力架上取下，加入 70 μ L 洗脱液，涡旋混匀。短暂离心，65°C 孵育 6 min，期间可涡旋混匀以提高洗脱效率。

14. 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

- 按照“一、手动单管提取”部分处理菌体沉淀（第 1-5 步），得到待用的 700 μL 上清液。
- 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
1/7 列	700 μL 上清液	全部加入
	异丙醇	300 μL
2/8 列	Wash Buffer A	500 μL
3/9 列	Wash Buffer B（已加无水乙醇）	500 μL
4/10 列	Wash Buffer B（已加无水乙醇）	500 μL
5/11 列	洗脱液	70 μL
6/12 列	磁珠悬浮液	20 μL
	Wash Buffer C	200 μL

注意：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 8 联磁棒套。
- 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°C 短期保存， -80°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
工位	6	1	2	3	4	5	6
等待时间	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	M1	M3	M3	M2	M2	M3	M1
混合时间	00:00:12	00:05:00	00:02:00	00:01:30	00:01:00	00:06:00	00:00:12
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:00:30	00:01:20	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:20	00:00:00
体积	200 μL	1000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	70 μL	200 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
工位	6	1	2	3	4	5	6
等待时间	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	M1	M3	M3	M2	M2	M3	M1
混合时间	00:00:12	00:05:00	00:02:00	00:01:30	00:01:00	00:06:00	00:00:12
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:00:30	00:01:20	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:20	00:00:00
体积	200 μL	1000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	70 μL	200 μL
温度	-	-	-	-	-	65 $^{\circ}\text{C}$	-

混合模式	M1	混合时间 10 s, 混合速度 100000
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 1-5 步），得到待用的 700 μL 上清液。
- 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	700 μL 上清液	全部加入
	异丙醇	300 μL
板位 2	Wash Buffer A	500 μL
板位 3	Wash Buffer B（已加无水乙醇）	500 μL
板位 4	Wash Buffer B（已加无水乙醇）	500 μL
板位 5	Wash Buffer C	500 μL
	磁珠悬浮液	20 μL
板位 6	洗脱液	70 uL

注意：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。
- 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
板位	5	1	2	3	4	6	5
等待时间	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	M1	M3	M3	M2	M2	M3	M1
混合时间	00:00:12	00:05:00	00:02:00	00:01:30	00:01:00	00:06:00	00:00:12
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:00:30	00:01:20	00:00:30	00:00:30	00:00:30	00:01:20	00:00:00
体积	200 μL	1000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	70 μL	200 μL
温度	-	-	-	-	-	65 °C	-
混合模式	M1	混合时间 10 s, 混合速度 100000					
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					