

磁珠法质粒DNA提取试剂盒（小提）

【产品名称】

商品名称：磁珠法质粒DNA提取试剂盒（小提）

【包装规格及适配仪器】

预分装：16T*6(适配 16通道全自动核酸提取仪)

预分装：96T(适配96通道全自动核酸提取仪)

非预分装：20T、100T、500T(手工提取和其他全自动核酸提取仪)

【预期用途】

用于质粒的提取、富集、纯化等步骤，其处理后的产物用于科研使用。

【检验原理】

本试剂盒是基于生物纳米磁珠的核酸提取试剂盒，主要原理 是利用功能性生物磁珠表面的功能基团，将核酸从样品裂解产物 中富集至磁珠表面，再利用磁性分离装置对磁珠进行分离，从而 快速分离纯化核酸。整个过程不需用到酚、氯仿等有机试剂，安 全无毒，并且利用具有顺磁性的生物纳米磁珠，适合高通量自动 化提取。

【主要组成成分】

货号	-16	-96	-20	-100	-500
规格	16T预分装	96T预分装	20T	100T	500T
Buffer I	5mL	22mL	5ml	22 mL	110 mL
Buffer II	5mL	22mL	5mL	22 mL	110 mL
Buffer III	5mL	22mL	5mL	22 mL	110 mL
结合液	96孔板*1板	96孔板*1板	7ml	35 mL	175 mL
磁珠&洗涤液I		96孔板*1板	13ml	65 mL	325 mL
洗涤液 II		96孔板*1板	5mL	22 mL	110 mL
洗涤液 III		96孔板*1板	13ml	65 mL	325 mL
洗脱液		96孔板*1板	4ml	20 mL	60 mL
RNase A	200μL	1.2 mL	200μL	1.2 mL	1.2 mL*5

【储存条件及有效期】

RNase A置于-20℃冻存，试剂盒其他组分置于室温(10~30℃)保存，有效期一年。Buffer I 加入RNase A后需2~8℃保存，尽快在3个月内使用完。

【适用样本】

适用于1-5mL过夜培养的菌液提取。

【自动提取（16通道设备以1和5通道加热为例）】

1. 打开仪器电源，待仪器完成自检后，根据表1-表2按对应的仪器型号设置程序参数：

表1：16通道全自动核酸提取仪程序

步骤	一	二	三	四	五	六	七
工位	2	1	2	3	4	5	2
等待时间	0	0	0	0	0	120s	0
混合模式	中速	中速	中速	中速	中速	慢速	中速
混合时间	30s	300s	240s	120s	60s	300s	60s

吸磁时间	60s	40s	40s	40s	40s	60s	0
体积	600μL	800μL	600μL	200 μL	600μL	100μL	600μL
温度	--	25℃	--	--	--	65℃	--

表2: 96通道全自动核酸提取仪

步骤	一	二	三	四	五	六	七
工位	2	1	2	3	4	6	2
等待时间	0	0	0	0	0	120s	0
混合模式	中速	中速	中速	中速	中速	慢速	中速
混合时间	30s	300s	240s	120s	60s	300s	60s
吸磁时间	60s	40s	40s	40s	40s	60s	0
体积	600μL	800μL	600μL	200μL	600μL	100μL	600μL
温度	--	25℃	--	--		65℃	--

2. (预分装试剂省略此步)非预分装试剂请预先将各组分(使用前务必充分摇匀)按照表4进行分装并做好标记:

表3: 组分装量-分布表

组分	规格装量	96T-工位	16T-布板
结合液	300μL/孔	工位1	1/7列
磁珠&洗涤液I	600μL/孔	工位2	2/8列
洗涤液 II	200μL/孔	工位3	3/9列
洗涤液 III	600μL/孔	工位4	4/10列
洗脱液	100μL/孔	工位6	5/11列

- 将RNase A溶液全部加入到Buffer I中, 混匀后, 置于2~8℃保存;
- 集菌, 取培养过夜的菌液1-5mL置于1.5ml离心管中, 12000rpm离心1min, 弃去上清;
- 向上述离心管中加入200μL Buffer I, 盖好盖子, 充分振荡重悬菌体, 保证无明显菌块的存在;
- 加入200μL Buffer II, 立即轻柔上下颠倒6-8次(切勿剧烈振荡), 室温放置2-4min (3mL菌以上4min, 其余2min), 使菌体充分裂解。此时溶液变成均一的紫色, 且开盖后能看到明显的“拉丝”现象;
- 加入200μL Buffer III, 立即反复颠倒6-8次, 使裂解好的菌液完全混匀, 此时可以看到明显的白色絮状沉淀, 且溶液颜色变为均一的黄色, 然后室温放置2-5min (3mL菌以上5min, 其余2min), 12000rpm离心2min或直接96孔过滤板抽滤;
- 离心或过滤完成后, 转移全部上清液 (离心法大约500μL, 过滤法大约450μL) 至结合液深孔板的样孔中 (16通道仪器, 取上清转移至深孔板的第1、7列), 吸取时应尽量避免吸到沉淀;
- 将结合液的深孔板放至工位1上, 将磁珠&洗涤液 I、洗涤液 II、洗涤液 III以及洗脱液的深孔板 (使用前先颠倒混匀数次使磁珠重悬, 再轻甩孔板使溶液均集中到孔板底部, 小心撕去封口铝膜, 避免孔板振动, 液体溅出) 分别置于工位2/3/4/6工位上, 运行程序;
注: 如果对质粒要求非常高, 可以在上机之前在洗涤液 II 中再加入5μL的RNase A (10mg/mL)。
- 程序结束后, 仪器会自动停止。洗脱液对应的的深孔板内为提取的核酸样品 (S-48/S-16 仪器、深孔板第5、11列内为提取的核酸样品), 该样品可以直接用于下游实验。若要长时间保存, 可以封装或转移至新的容器中, 置于-20℃冰箱保存。

【手动提取】

- 1、将 RNase A 溶液全部加入到Buffer I中，混匀后，置于 2~8℃保存。
- 2、集菌，取培养过夜的菌液1-5mL置于1.5ml 离心管中，12000 rpm离心1 min，弃去上清（如果菌液多于1.5ml，需要进行多次离心操作）。
- 3、向上述离心管中加入200μL Buffer I，并盖好盖子，充分振荡重悬菌体，保证无明显菌块的存在。
- 4、加入200 μL Buffer II，立即轻柔上下颠倒6-8次(切勿剧烈振荡),室温放置2-4min（3mL菌以上4min，其余2min），使菌体充分裂解。此时溶液变成均一的紫色，且开盖后能看到明显的“拉丝”现象。
- 5、加入200 μL Buffer III后，立即反复颠倒6-8次，使裂解好的菌液完全混匀，此时可以看到明显的白色絮状沉淀，且溶液颜色变为均一的黄色，然后室温放置2-5min（3mL菌以上5min，其余2min），12000rpm离心2min或者直接96孔过滤板抽滤。
- 6、步骤5完成后，转移全部上清液（离心法大约500μL，过滤法大约450μL）到干净的离心管中，吸取时应尽量避免吸到沉淀；向每个样本管中加入300 μL结合液。
- 7、取600μL磁珠&洗涤液 I 置于磁力架上，静置1min，转移上清至另一干净EP管中待用，将步骤6中全部液体转入磁珠中，振荡混匀后静置5min，期间振荡混匀3 次。
- 8、将离心管置于磁力架上，静置1min，期间反复颠倒磁力架5~6次，使可能残存在管盖上的磁珠被磁力架吸附住，小心用移液器吸去管盖和管中的液体。
- 9、取下离心管，加入步骤7中待用液体，将离心管振荡混匀4 min 后再置于磁力架上，静置1min，期间反复颠倒磁力架5~6次，磁珠完全吸附后，小心用移液器吸去管盖和管中液体。
- 10、加入200 μL 洗涤液 II,将离心管振荡混匀2 min 后再置于磁力架上，静置1min，期间反复颠倒磁力架5~6次，磁珠完全吸附后，小心用移液器吸去管盖和管中液体。
- 注：如果对质粒要求非常高，可以在洗涤液 II 中加入5μL的RNase （10mg/mL）。
- 11、加入600 μL 洗涤液 III,将离心管振荡混匀1 min 后再置于磁力架上，静置1min，期间反复颠倒磁力架5~6次，磁珠完全吸附后，小心用移液器吸去管盖和管中液体。
- 12、打开管盖，室温干燥3-5 min 至乙醇挥发完全(乙醇残留和过分子干燥均会影响下一步核酸洗脱效率)。
- 13、取下离心管，加入100 μL洗脱液，振荡混匀使磁珠完全浸没在洗脱液 中，再置于65℃孵育5min，期间振荡混匀3次。
- 14、孵育结束后，将离心管置于磁力架上，静置1min，待磁珠完全吸附 后，小心用移液器将液体转移至新的干净的离心管中(切勿将磁珠 吸出),所得溶液即为核酸样品。
- 15、该样品可以直接用于下游实验，若要长时间保存，请置于-20℃冰箱。

【注意事项】

- 1) 操作注意安全防护：样本提取应在规定的实验场所进行，穿戴防护 衣物、一次性手套和口罩；有直接接触过样本的物品应进行消毒后 丢弃或再次使用。
- 2) 除非另有说明，所有的操作均在室温（10–30℃）完成。
- 3) 实验前应对全自动核酸提取仪进行紫外线消毒，并用75%乙醇定期清理实验台和样本提取专用移液器。
- 4) 接触试剂的材料均要求干燥、洁净，以防止污染。
- 5) Buffer II 可能会有沉淀析出，属正常现象，将其置于42℃烘箱或水浴中，待沉淀溶解后混匀再用。
- 6) 手动提取时，如果所提质粒为低拷贝质粒或大于10KB的大质粒，应加大菌体使用量，使用5-10mL 过夜培养物，同时按照比例增加Buffer I、Buffer II、Buffer III的用量，吸附和洗脱时可以适当的延长延长时间，以增加提取效率。
- 7) 手动提取时，磁珠干燥放置时间不宜过长，过度干燥会影响提取结果。