

GNM 磁珠法质粒 DNA 小量提取试剂盒 说明书

货 号:

HCD0704-100 (100T)

HCD0704-500 (500T)

HCD0704-2000 (2000T)



一、试剂盒简介

磁珠法质粒 DNA 小量提取试剂盒是磁性纳米分离技术与细菌细胞的 SDS 碱裂解法相融合，用以从菌体中高效提取高质量的质粒 DNA。在离心力的作用下，细胞碎片与 SDS 复合物会沉淀下来。特定条件下，磁珠能够吸附存在于上清液中的质粒 DNA，而其他杂质如蛋白质、盐离子等则可通过洗涤被有效除去。当条件发生改变时，磁珠会释放其所吸附的质粒 DNA。对于高拷贝质粒而言，从 2 mL 过夜培养的菌液（OD600 = 2.0）中能够获取超过 15 μ g 的质粒 DNA。经由本试剂盒抽提所得的质粒纯度高，D260/OD280 比值通常处于 1.8 ~ 1.9 之间，OD260/OD230 比值大于 2.0，可直接应用于转化、DNA 测序、PCR 以及酶切等后续实验。

此试剂盒的操作流程简便快捷，无需复杂设备，即可在常规离心管和磁力架中手动完成。同时，也支持配合磁转移式核酸提取仪器使用，实现全过程的自动化处理，进一步提升实验效率和准确性。

二、储存条件及有效期

1. 在 10-30℃条件下储存，有效期 12 个月。
2. 产品批号、生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

组分名称	HCD0704-100 (100T)	HCD0704-500 (500T)	HCD0704-2000 (2000T)
磁珠 S	1.5 mL	7.5 mL	30 mL
Buffer I	20 mL	100 mL	400 mL
Buffer II	20 mL	100 mL	400 mL
Buffer III	35 mL	175 mL	700 mL
Wash Buffer	30 mL	150 mL	300 mL*2
Elution Buffer	10 mL	50 mL	200 mL
RNase A (10 mg/ml)	80 μ L	400 μ L	1.6 mL

(a) 首次使用前，必须在 Wash Solution 瓶中加入指定倍体积的无水乙醇，充分混匀后使用。每次使用后将瓶盖拧紧，以保持 Wash Solution 中的乙醇含量。如果发现 Wash Solution 因运输或保管不当造成容量严重不准，请用量筒定容后再加入等比例体积的无水乙醇。

(b) 试剂盒中的磁珠 S 和加入 RNase A 的 Buffer I 请存放于 2-8℃，其他试剂室温保存，有效期详见包装。

四、操作步骤

根据手动 ro 提取仪选择自备材料：磁力架、水浴锅、小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12,000 \times g$ ）、1.5 ml 离心管、异丙醇，板式离心机、自动化核酸提取仪、移液器、涡旋振荡器或 96 孔板混匀仪。



试剂盒初次开启，将 RNase A 全部加入 Buffer I 中，充分混匀后在瓶身做好标记。储存于 2~8℃，有效期 6 个月。

每次使用前请检查 Buffer II 是否出现沉淀，如有沉淀，请于 37℃溶解沉淀，待冷却至室温后使用。

质粒提取前处理：

1. 在含有合适抗生素的培养基中接种目标菌株，于 37℃摇床进行充分振荡培养 12~16 小时。
 - ✚ 菌液状态对质粒 DNA 的得率起着至关重要的作用，培养时请使用不超过容器容量 1/4 体积的培养基。
 - ✚ 处于生长平台期的菌体用于质粒抽提时得率最高，过度培养可能会导致 DNA 降解。
2. 对于高拷贝质粒，取 1~2 mL 菌液，在室温下以 10,000 rpm 离心 2 min 收集菌体，吸净上清液。
 - ✚ 对于高拷贝质粒，从 2 mL 过夜培养的菌液中通常可以获得超过 15 μg 的质粒 DNA，不建议使用更大的菌液量。
 - ✚ 对于低拷贝质粒，如果使用更多的菌液，则可将同一个样品分多管收集，每管不超过 5 mL，分别进行裂解，然后用同一批磁珠 S 吸附质粒 DNA，以获得更高的得率。
3. 向菌体沉淀中加入 200 μL Buffer I，通过吸打或振荡使其彻底悬浮菌体。
 - ✚ Buffer I 在首次使用时，请检查是否已加入 RNase A。
 - ✚ 务必彻底悬浮菌体，否则会影响得率和质量。
4. 加入 200 μL Buffer II，立即温和颠倒离心管 5~10 次进行混匀，在室温下静置 3~5 min 直至完全裂解。
 - ✚ 裂解时间与菌量相关，菌量多时应适当延长时间，最长不能超过 5 min。
 - ✚ 如果同时操作多个样品，每加入一管就混匀一管，不要采用全部加入后一起混匀的方法，计时从第一管样品加入时开始。
 - ✚ 混匀时，动作要温和，若剧烈震荡，可能会使基因组 DNA 被打断并混杂在质粒中。
5. 加入 350 μL Buffer III，立即温和颠倒离心管 5~10 次充分混匀。
 - ✚ 如果同时操作多个样品，每加入一管就混匀一管，不要采用全部加入后一起混匀的方法。
 - ✚ 如果起始菌液较多，混匀后可在室温下静置 5 min 以彻底去除 RNA。
6. 在离心机以最大转速(≥12,000 rpm)离心 5~10 min，

• 手动法纯化步骤：

1. 小心吸取 600 μL 上清并转移至新的 1.5 mL 离心管中，然后向上清液中加入 100 μL 异丙醇和 15 μL 磁珠 S，温和混匀，在室温下静置 1 min。
 - ✚ 加入磁珠 S 之前，请将其充分混匀。



- ✦ 务必将磁珠 S 加至液面以下，尽量将枪头上残留的磁珠 S 吸打干净。
- 2. 将离心管置于磁力架上 5 min，待磁珠 S 完全吸附至管壁上之后，吸弃上清，然后从磁力架上取出离心管。
 - ✦ 吸弃上清前，若管口粘有少量磁珠 S，请用上清液将其洗至离心管内，以确保所有磁珠 S 吸附至管壁上。
 - ✦ 当所有磁珠 S 完全吸附至管壁上时，上清液应是无色澄清的，若 5 min 后上清液为淡黄色，请适当延长吸附时间，直到上清液无色澄清。
 - ✦ 吸弃上清时，请勿吸入磁珠 S，尽量吸净上清。
 - ✦ 从磁力架上取出离心管后，若有少量上清，请将离心管置于磁力架上，再次吸取上清。
- 3. 向离心管中加入 500 μ L Wash Buffer，缓慢吸打混匀，将离心管置于磁力架上 1 min，待磁珠 S 完全吸附至管壁上之后，吸弃上清，从磁力架上取出离心管。
 - ✦ 吸弃上清前，若管口粘有少量磁珠 S，请用上清液将其洗至离心管内，以确保所有磁珠 S 吸附至管壁上。
 - ✦ 吸上清时，请勿吸入磁珠 S，尽量吸净上清。
- 4. 重复步骤 8 一次，在室温下开盖干燥 15~20 min，或者在 55 $^{\circ}$ C 恒温箱中开盖干燥 5~7 min，直至管内无液体残留。
 - ✦ 干燥前，请尽量将管内液体吸干。
 - ✦ 干燥前，若出现液体挂壁现象，可将离心管短暂离心之后，再将其置于磁力架上，待所有磁珠 S 完全吸附至管壁之后再吸净管内液体。
- 5. 加入 50~100 μ L 的 Elution Buffer，在 65 $^{\circ}$ C 水浴中放置 5~10 min，间或混匀。
 - ✦ 请将管壁上所有磁珠 S 悬浮在 Elution Buffer 中。
 - ✦ 根据实验需要，可以将 Elution Buffer 用无菌的双蒸水代替。
- 6. 取出离心管并置于磁力架上 1 min，待磁珠 S 完全吸附至管壁上之后，吸取上清至新的离心管，即可获得纯净的质粒 DNA。
 - ✦ 吸取上清前，请确保所有磁珠 S 完全吸附至管壁，请勿吸入磁珠 S，否则会影响产物纯度。

• N32 全自动核酸提取仪纯化步骤:

1. 小心吸取 600 μ L 上清并转移至第一列或第七列中，之后每孔加入 100 μ L 异丙醇。
2. 在第二列或第八列中加入 500 μ L Wash Buffer。
3. 在第三列或第九列中加入 500 μ L Wash Buffer。
4. 在第五列或第十列中加入 15 μ L 全重悬的磁珠 S 及 285 μ L 纯化水。
5. 在第六列或第十二列中加入 100 μ L Elution Buffer。
6. 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置。



7. 把塑料磁力套插入相应位置。
8. 点击“运行”相应程序。
9. 程序结束，发出“滴滴”声，立即取出深孔板，将样品纯化产物全部转移到新的离心管。纯化的 DNA 可立即使用，也可-20° C 长期储存。

N32 全自动核酸提取仪程序参数

步骤	名称	孔位	等待时间 (秒)	混合速度 (1-3)	混合时间 (秒)	容积 (μ L)	吸磁时间 (秒)	温度 ($^{\circ}$ C)
1	add beads	5	0	3	60	300	30	0
2	Binding	1	0	3	300	900	60	0
3	Wash1	2	0	3	120	500	30	0
4	Wash2	3	0	3	60	500	30	0
5	Elution	6	180	2	360	100	60	70
6	Abandon	5	0	2	30	300	0	0

注：根据不同的**机型**可以调整相应试剂位置及体积，运行对应程序。

五、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。

