

质粒小提试剂盒（磁珠法）

货号：MBD08

【概述】

本试剂盒采用碱裂解法裂解细胞，再通过具有独特分离作用的磁珠和缓冲液系统在高盐状态下特异性地结合溶液中的质粒 DNA。使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接、转化、文库筛选、体外翻译、转染一些常规的传代细胞等。

【适用范围】

本试剂盒适用于提取大肠杆菌等（1-2 mL 过夜培养， $OD_{660}=1.7-2.0$ ）的质粒 DNA。

【试剂盒包装及组成】

试剂盒组成	规格			
	10T	50T	100T	200T
裂解液 R1	2.8 mL×1	14 mL×1	28 mL×1	56 mL×1
裂解液 R2	2.8 mL×1	14 mL×1	28 mL×1	56 mL×1
裂解液 R3	4 mL×1	20 mL×1	38.5 mL×1	77 mL×1
RNase A（10 mg/mL）	0.077 mL×1	0.35 mL×1	0.7 mL×1	1.4 mL×1
磁珠	0.55 mL×1	1.4 mL×2	5.6 mL×1	11 mL×1
洗涤液 RW	3.3 mL×1	16.5 mL×1	33 mL×1	66 mL×1
漂洗液	/	1（空瓶）	1（空瓶）	1（空瓶）
洗脱液	1.5 mL×1	7.5 mL×1	15 mL×1	30 mL×1
使用说明书	1 份	1 份	1 份	1 份
磁铁	1 块	/	/	/

【储存条件】

- 磁珠可以在室温下（15-25℃）运输，但请置于 2-8℃ 保存。
- 本试剂盒其余试剂室温保存，有效期 12 个月，更长时间的保存可置于 2-8℃。2-8℃ 保存条件下，若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，必要时可在 37℃ 水浴中预热 10 min 溶解沉淀，摇匀后使用。第一次使用前请将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入裂解液 R1 中，混匀，置于 2-8℃ 保存，保存时间 6 个月。

【注意事项】

- 第一次使用前请将试剂盒中提供的 RNase A 全部加入裂解液 R1 中，混匀，置于 2-8℃ 保存。
- 使用前请注意检查裂解液 R2 是否出现混浊，如有混浊现象，可在 37℃ 水浴中加热几分钟，恢复澄清后再使用。实验过程中不要直接接触裂解液 R2 和 R3，并注意使用后，立即拧紧盖子。
- 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。
- 整个裂解过程操作尽量温和，并在要求时间内完成。
- 客户自备试剂：无水乙醇、离心管、水浴锅、离心机（最大离心力 ≥ 12000 rpm ($\sim 10010\times g$)）。
- 请于本实验开始前穿上实验服、佩戴手套及口罩、眼镜等防护用具，避免实验操作过程中试剂沾染皮肤、眼睛等。如不慎发生以上情况，请立即用清水冲洗，必要时请及时就医。
- 使用前请预先在漂洗液瓶或离心管中配制 75%乙醇，并提前将水浴锅调至 56℃ 备用。
- 磁珠在使用前一定要充分混匀。磁珠加入后，请尽量减少用枪头吹打混匀，防止磁珠沾在枪头上，造成基因组 DNA 损失。

【操作步骤】**1. 从平板培养基上挑取单菌落接种至液体培养基中，过夜培养。**

- 有些细菌在培养到指数后期会在胞外分泌大量粘性多糖，影响裂解，这种情况下培养时间不宜过长，可以在指数前中期多次收集保证菌量。

2. 取 1-2 mL 的菌液 ($OD_{660}=1.7-2.0$) 于离心管中，12000 rpm ($\sim 10010\times g$) 离心 1 min，弃上清。

- 菌液较多时可通过多次离心将菌体收集到一个 1.5 mL 离心管中。

3. 向离心管中加入 250 μ L 裂解液 R1 (含 RNase A) 充分悬浮细菌沉淀。

- 裂解液 R1 加入前，请检查是否已加入 RNase A。如未加入，会造成质粒 DNA 制备物中混有 RNA。
- 可使用移液器或涡旋振荡器彻底混匀菌体沉淀。如有未彻底混匀的菌块，会导致裂解不充分，影响提取量及纯度。

4. 向离心管中轻柔加入 250 μ L 裂解液 R2，温和地上下翻转离心管 5-6 次，使菌体充分裂解，形成透明溶液。

- 请温和地混匀，切勿剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成质粒 DNA 制备物中混有基因组 DNA 的碎片。
- 菌体完成裂解后，应变的清亮粘稠，打开离心管管盖时有拉丝。如菌液未变清亮，可能是菌体过多，裂解不充分，请减少菌体用量。
- 此步骤不宜超过 5 min，以免造成质粒 DNA 损伤。

5. 向离心管中轻柔加入 350 μ L 裂解液 R3，立即温和地上下翻转离心管 5-6 次，此时可见白色絮状沉淀。12000 rpm ($\sim 10010\times g$) 离心 5 min。

- 裂解液 R3 加入后，请立即混匀，避免产生局部沉淀。并注意操作温和，以免造成基因组 DNA 断裂。
- 如离心结束后，上清中还漂浮有白色絮状物，请再次离心后取上清，以免影响质粒 DNA 制备物的纯度。

6. 吸取 750 μ L 上清于新的离心管 (2 mL 离心管，客户自备) 中，加入 1 mL 无水乙醇，颠倒混匀 10 sec，再向离心管中加入 50 μ L 磁珠，轻柔振荡混匀，室温静置 3 min，期间颠倒混匀 2-3 次。

- 请注意尽量不要触及或吸出沉淀。
- 向离心管中加入磁珠之前，请确保磁珠彻底重悬，可在使用前振荡混匀。
- 确保磁珠在结合过程中呈悬浮状态。

7. 将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，用移液器小心去除上清。

- 若离心管管口及管壁上沾有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管，可参考如下步骤：将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附于管壁后，上下颠倒磁力架，使沾在管口的磁珠重悬至溶液中，避免磁珠损失。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。
- 本公司有多功能磁力架（MB11），无需使用移液器吸净废液，直接倾斜磁力架将废液倒出即可，可根据需要购买。

8. 向离心管中加入 1 mL 无水乙醇，轻柔混匀 1 min，将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，弃上清。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。

9. 向离心管中加入 300 μ L 洗涤液 RW，轻柔混匀 1 min，将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，弃上清。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。

10. 从磁力架或磁铁上取下离心管，加入 600 μ L 漂洗液（使用前请预先配制 75%乙醇），轻柔混匀 1 min，将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，弃上清。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。

11. 重复步骤 10 一次。

- 若离心管管口及管壁上粘有少量磁珠，请将磁珠重悬至离心管。
- 吸弃废液时，尽量吸净管盖及管底残液，请勿吸入磁珠。
- 为缩短后续晾干时间，可将离心管 10000 rpm 离心 1 min，再置于磁力架或磁铁上进行磁分离，再次吸弃废液。

12. 室温开盖晾干 5-10 min（可将离心管开盖置于超净工作台或吹风机冷风口），至乙醇完全挥发（侧面观察磁珠无反光；反面观察磁珠颜色由棕黑色变为深褐色，边缘龟裂；无液体挂壁）。

- 室温晾干前，请先尽量吸净残液。乙醇残留会抑制后续的酶反应（如酶切、PCR 等）实验，应确保乙醇完全挥发后再进行下一步操作。但也不能干燥太久（磁珠不能完全龟裂），以免质粒难以洗脱。

13. 从磁力架或磁铁上取下离心管，加入 100 μ L 洗脱液，振荡混匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，每隔 2-3 min 轻摇离心管混匀 3-5 次。

- 为缩短洗脱时间，可将洗脱液提前预热至 56℃，再加入离心管中，水浴 5-10 min，但请注意水浴时间低于 10 min 可能会影响质粒的得率。
- 水浴前请先用洗脱液将离心管壁上的所有磁珠冲洗至离心管内，可参考如下步骤：向离心管中加入 100 μL 洗脱液，倾斜离心管，使洗脱液没过吸附在管壁上的磁珠，轻轻晃动离心管至磁珠完全重悬至洗脱液中。
- 如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。但应保证去离子水的 pH 值在 7.0-8.5 之间，若 pH 值不在此范围内，会影响洗脱效率。

14. 将离心管置于磁力架或磁铁上进行磁分离，小心吸取上清至新的离心管中，所得上清即目的质粒 DNA，可直接进行下游实验或于适当条件保存。

- 可先将离心管 10000 rpm 离心 1 min，再进行磁分离，以确保所有磁珠完全吸附至管壁。
- 尽量吸净上清，但请勿吸入磁珠，以免影响质粒 DNA 的纯度及 DNA 溶液的颜色。

【常见问题及参考意见】

1. 得率低

- 菌液状态对质粒 DNA 得率非常关键，请用不超过容器容量 25% 体积的培养基培养细菌；
- 处于细菌生长平台期的菌体用于质粒 DNA 提取得率最高；
- 裂解时间与菌量有关，菌量多则适当延长裂解时间，最长不能超过 5 min（如果同时操作多组样本，每加一管则混匀一管，不可采用加完所有样本再混匀的方法，计时从第一个管样本混匀开始）；
- 结合不充分：结合过程中要使磁珠一直处于悬浮状态，并且充分颠倒混匀；
- 取样量大于说明书给出量：取样量请严格按照说明书操作。

2. 质粒 DNA 样品不纯，干扰后续实验

- 质粒 DNA 样品有乙醇残留：吸弃废液时，请尽量吸净管盖及管底残液。为缩短后续晾干时间，可将离心管 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再置于磁力架或磁铁上进行磁分离，再次吸弃废液。室温晾干至磁珠表面无反光、无液体挂壁；
- 磁珠洗涤不充分：加入 75% 乙醇时，请确保所有磁珠均重悬于液体中，并充分振荡混匀；
- 质粒 DNA 液中吸入磁珠：如果不小心吸入磁珠，请将上清液返回原管，待磁珠完全吸附至管壁后重新吸取上清。或者将吸取的上清液 10000 rpm (~6953×g) 离心 1 min，再取上清；
- 质粒 DNA 液中含有轻微盐离子等杂质，此为洗脱液正常现象，不影响下游实验。如有特殊需要，可使用等量的经高压灭菌的去离子水作为洗脱液。为方便实验，可将获得的质粒 DNA 液置于 -20℃ 环境分装保存。