

磁珠法无内毒素质粒中量提取试剂盒

Mag-Bind[®] Endo-Free Plasmid Mini Kit

货号	M1272-00	M1272-01
反应次数	1 x 24	4 x 24
Solution I	70 mL	270 mL
Solution II	70 mL	270 mL
N3 Buffer	60 mL	250 mL
IRD Buffer (使用前请稀释)	100 mL	2 x 160 mL
VHB Buffer (使用前请稀释)	44 mL	2 x 88 mL
Endo-free Water	60 mL	2 x 60 mL
Mag-Bind [®] Particles RQ	6 mL	22 mL
RNase A	300 μ L	1.2 mL
User Manual	√	√

★ 保存方式及稳定性

1. 按条件保存的试剂盒保质期为 24 个月（见盒外失效日期），所有组分均可常温运输；
2. 收到试剂盒后，请把 RNase A 置于-20°C作长期保存；
3. 把 RNase A 对应加入到 Solution I 后请置于 2-8°C保存；
4. Mag-Bind[®] Particles RQ 长期保存建议放置 2-8°C，使用前须充分摇匀；
5. 当贮存温度较低时，Solution II 易析出沉淀，请在使用前把整瓶试剂置于 37°C 中至沉淀完全溶解，充分混匀后再使用；
6. 本试剂盒仅供科学研究使用。

★ 实验前准备

1. 将整管 RNase A 加入到 Solution I 瓶内，混匀后 2-8°C保存；
2. 按照下表配置 IRD Buffer 与异丙醇混合液，该溶液需现配现用，切勿原瓶稀释。该预混液将分别用于结合步骤和第一次洗涤步骤，请根据反应份数配置所需体

积，配置后室温放置备用；

试剂	每份反应（含结合、洗涤）需量
IRD Buffer	1.57 mL
异丙醇	1.93 mL

3. 按照下表提示，使用【无水乙醇】对 VHB Buffer 进行稀释，稀释后均置于室温保存；

货号	无水乙醇 加入量
M1272-00	56 mL
M1272-01	112 mL/瓶

4. # **重要**: Mag-Bind® Particles RQ 使用前需彻底涡旋混匀，让磁珠液均匀分散，倒置瓶身时看不到磁珠在底部堆积沉淀。如使用未经彻底打散的磁珠，容易引起产量低或不稳定的问题；
5. # **重要**: 洗脱液 Endo-free Water 在多次反复开盖使用后，易引起内毒素水平升高，如有需要可按照实际需求分装保存。

★ 用户自备仪器及耗材：

- ✓ 离心速度可达 13,000xg 的离心机
- ✓ 转速可达 1,500 rpm 的摇床、涡旋仪
- ✓ 异丙醇、无水乙醇、70%乙醇
- ✓ 无菌无热源的枪头
- ✓ 无菌无酶的 1.5 或 2 mL、15 mL 和 50 mL 离心管
- ✓ 2.2 mL24 深孔板

★ 实现低内毒素水平的建议步骤：

1. 实验开始前使用 70%乙醇清洁工作台表面和移液器。
2. 实验过程中要经常更换手套。
3. 对于内毒素敏感的样本，请使用无内毒素或无热原的塑料移液器吸头等耗材。
4. Endo-free Water 置于 4°C 下保存，洗脱液 Endo-free Water 在多次反复开盖使用后，易引起内毒素水平升高，如有需要可按照实际需求分装保存。

★ 提取步骤——≤5 mL 菌液提取（单管）

1. 取 5 mL 大肠杆菌接种在含有 LB 或其他选择性培养基的培养瓶中（培养基的体积不高于培养瓶的 1/4），37°C 下摇晃培养 12-16 小时后转移到 15 ml 离心管内（自备）；

注意：细胞的密度 OD600 建议不要超过 3.0，强烈建议使用 *endA*-基因型大肠杆菌菌株，例如 DH5 α [®] 和 JM109[®] 两种菌株。

2. 室温下 4,000×g 离心 10min，收集菌体；
3. 弃除上清培养基，加入 1.25 mL Solution I，涡旋振荡使细菌完全分散；
注意：Solution I 使用前必须加入 RNase A，如果菌液未能完全悬浮则会影响产物的质量。
4. 往重悬液中加入 1.25 mL Solution II，轻轻颠倒数次混匀，如有必要，可把裂解液置于室温静置 2-3min；
注意：避免剧烈混合裂解液，静置时间不应超过 5min，否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低，当使用完 Solution II 以后，须盖紧瓶盖保存。
5. 根据需要从以下步骤三选一进行操作：

A. 通过离心去除沉淀：

- (1) 加入 1 mL N3 Buffer，温和颠倒 10 次至形成白色絮状沉淀；
- (2) 室温下 4,000×g 离心 10min；
- (3) 转移 2.5 mL 上清液至新的 15 mL 离心管，避免转移到沉淀；
- (4) 继续按第 5 页步骤 6 操作。

B.通过过滤针筒（自备）去除沉淀：

注意：试剂盒内不提供过滤针筒（货号#PD093），请按需单独购买。

- (1) 加入 1 mL N3 Buffer，温和颠倒 10 次，直至形成白色絮状沉淀；
- (2) 准备过滤针筒(自备)，拉出针筒中的活塞，把蓝色盖子盖在针筒出液位置，将针筒竖直放在合适的试管架上，在针筒下端出口处放置一个收集管，针筒开口朝上。；
- (3) 将步骤 B-(1) 中的裂解液倒入过滤器的针筒中，让液体在针筒中停留 5min，小心轻轻地将针筒活塞插入，慢慢推动活塞使裂解液流入到 15 mL 收集管中；
注意：白色絮状物中可能会残留一些裂解液，切勿强行将这些残留的裂解液推出过滤器。如果有沉淀留到过滤液中，离心去除沉淀；
- (4) 继续按第 5 页步骤 6 操作。

C.通过磁珠（自备）去除沉淀：

注意：试剂盒内不提供 Mag-Bind[®] Particles LC（货号#MBPLC-05），请按需单独购买。

- (1) 根据下表配置 N3 Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles LC，配置好的试剂需要在 72 小时内用完。

试剂	加入量/样	每 24 份反应 加入总量
N3 Buffer	1 mL	26.4 mL
Mag-Bind [®] Particles LC	200 μ L	5.28 mL

*每块 24 深孔板加入的试剂总量已按 10%预算损耗体积。

- (2) 加入 1.2 mL N3 Buffer/Mag-Bind[®] Particles LC 预混液，颠倒 20 次，直至形成白色絮状沉淀。
- (3) 将离心管置于磁力架上，在室温下静置，直到 Mag-Bind[®] Particles LC 被完全吸附，溶液变得澄清。
注意：如果 5 分钟后 Mag-Bind[®] Particles LC 仍漂浮在液体顶部，可使用移液枪从顶部吸取液体并缓慢打至离心管底部，使 Mag-Bind[®] Particles LC 更接

近磁力架。

(4) 转移 2.5 mL 上清液至新的 15 mL 离心管，避免转移到沉淀。

(5) 继续按第 5 页步骤 6 操作。

6. **加入 2.5 mL IRD Buffer/异丙醇预混液和 50 μ L Mag-Bind[®] Particles RQ，颠倒或吸打混匀 10 次，室温孵育 10 min，孵育过程中需保持混匀状态，切勿涡旋；**

注意：请按第 2 页“实验前指引”配置 IRD Buffer/异丙醇预混液，需现配现用，切勿原瓶稀释！

7. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清，该过程需时约 3-5min，待磁珠完全吸附于管内一侧。吸磁期间可以颠倒几次把管壁及管盖上磁珠冲洗到液体里。小心吸除上清；
8. 将 15 mL 离心管从磁力架上取下，**加入 1 mL IRD Buffer/异丙醇预混液，最大速度涡旋 5min；**
9. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清，磁珠完全吸附于管内一侧。吸磁期间可以颠倒几次把管壁及管盖上磁珠冲洗到液体里。小心吸除上清；
10. 将 15 mL 离心管从磁力架上取下，**加入 1 mL VHB Buffer（已加无水乙醇正确稀释），最大速度涡旋 1min；**
11. **【非常重要】把 VHB Buffer/Mag-Bind[®] Particles RQ 混合液全部转移到一个新的 1.5 mL 离心管中，高速涡旋 1min。弃除旧离心管；**
12. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清，磁珠完全吸附于管内一侧。吸磁期间可以颠倒几次把管壁及管盖上磁珠冲洗到液体里。小心吸除上清；
13. 将离心管从磁力架上取下，**加入 1 mL VHB Buffer（已加无水乙醇正确稀释），最大速度涡旋 1min；**
14. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清，磁珠完全吸附于管内一侧。吸磁期间可以颠倒几次把管壁及管盖上磁珠冲洗到液体里。小心吸除上清；
15. 将离心管从磁力架上取下，**加入 1 mL 70%乙醇（自备），最大速度涡旋 1min；**
16. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清，磁珠完全吸附于管内一侧。吸磁期间可以颠倒几次把管壁及管盖上磁珠冲洗到液体里。小心吸除上清；

17. 将离心管继续放置在磁力架上，打开管盖等待 1min，让液体全部流到底部，如管盖管底有残留的液滴，请用移液枪完全吸弃。室温静置 10min 干燥 Mag-Bind[®] Particles RQ，；
18. 将离心管从磁力架上取下，加入 100 μ L Endo-free Water 至管中，涡旋混匀 3min 打散 Mag-Bind[®] Particles RQ 洗脱 DNA；
19. 将 15 mL 离心管放置在磁力架上，直至 Mag-Bind[®] Particles RQ 被完全吸附；
20. 将纯化好的 DNA 上清液转移到一新的 1.5 mL 离心管中放置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

★ 提取步骤—— ≤ 50 mL LB / ≤ 50 mL TB 培养菌液提取（单管）

1. 将 50 mL 大肠杆菌接种在含有 LB 或其他选择性培养基的培养瓶中（培养基的体积不高于培养瓶的 1/4），37 $^{\circ}$ C 下摇晃培养 12-16 小时后转移到 50 mL 离心管内（自备）。

注意：细胞的密度 OD600 建议不要超过 3.0，强烈建议使用 *endA*-基因型大肠杆菌菌株，例如 DH5 α [®] 和 JM109[®] 两种菌株。

2. 室温下 4,000 \times g 离心 10min，收集菌体；
3. 弃除上清培养基，加入 2.5 mL Solution I，涡旋振荡使细菌完全分散；
注意：Solution I 使用前必须加入 RNase A，如果菌液未能完全悬浮则会影响产物的质量。
4. 往重悬液中加入 2.5 mL Solution II，轻轻颠倒混匀 8-10 次，如有必要，可把裂解液置于室温静置 2-3min；
注意：避免剧烈摇晃裂解液，静置时间不应超过 5min，否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低，当使用完 Solution II 以后，须盖紧瓶盖保存。
5. 根据需要从以下步骤三选一进行操作：

A. 通过离心去除沉淀：

- (1) 加入 2 mL N3 Buffer，温和颠倒 10 次，直至形成白色絮状沉淀；
- (2) 室温下 4,000 \times g 离心 10min；
- (3) 转移 5.5 mL 上清液至新的 15 mL 离心管，避免转移到沉淀；
- (4) 继续按第 8 页步骤 6 操作。

B.通过过滤针筒（自备）去除沉淀：

注意：试剂盒内不提供过滤针筒（货号#PD093），请按需单独购买。

- (1) 加入 2 mL N3 Buffer，温和颠倒 10 次，直至形成白色絮状沉淀；
 - (2) 准备过滤针筒(自备)，拉出针筒中的活塞，把蓝色盖子盖在针筒出液位置，将针筒竖直放在合适的试管架上，在针筒下端出口处放置一个收集管，针筒开口朝上。；
 - (3) 将步骤 B-(1) 中的裂解液倒入过滤器的针筒中，让液体在针筒中停留 5min，小心轻轻地将针筒活塞插入，慢慢推动活塞使裂解液流入到 50 mL 收集管中；
- # 注意：**白色絮状物中可能会残留一些裂解液，切勿强行将这些残留的裂解液推出过滤器。如果有沉淀留到过滤液中，离心去除沉淀；
- (4) 继续按第 8 页步骤 6 操作。

C.通过磁珠去除沉淀：

注意：试剂盒内不提供 Mag-Bind[®] Particles LC（货号#MBPLC-05），请按需单独购买。

- (1) 根据下表配置 N3 Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles LC，配置好的试剂需要在 72 小时内用完。

试剂	加入量/样	每 24 份反应加入总量
N3 Buffer	2 mL	52.8 mL
Mag-Bind [®] Particles LC	600 μ L	15.8 mL

*每块 24 深孔板加入的试剂总量已按 10%预算损耗体积。

- (2) 加入 2.6 mL N3 Buffer/Mag-Bind[®] Particles LC 预混液。颠倒 20 次，直至形成白色絮状沉淀；
- (3) 将离心管置于磁力架上，在室温下静置，直到 Mag-Bind[®] Particles LC 被完全吸附，溶液变得澄清。

注意：如果 5 分钟后 Mag-Bind[®] Particles LC 仍漂浮在液体顶部，可使用移

液枪从顶部吸取液体并缓慢打至离心管底部, 使 Mag-Bind[®] Particles LC 更接近磁力架。

(4) 转移 5.5 mL 上清液至新的 15 mL 离心管, 避免转移到沉淀。

(5) 继续按第 8 页步骤 6 操作。

6. **加入 5.5 mL IRD Bufferr/异丙醇预混液和 200 μ L Mag-Bind[®] Particles RQ, 颠倒或吸打混匀 10 次, 室温孵育 10 min, 孵育过程中需保持混匀状态, 切勿涡旋;**

注意: 请按第 2 页“实验前指引”配置 IRD Buffer/异丙醇预混液, 需现配现用, 切勿原瓶稀释!

7. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清, 该过程需时约 3-5min, 待磁珠完全吸附于管内一侧, 吸磁期间可以颠倒几次把管壁及管盖上磁珠冲洗到液体里, 小心吸除上清;
8. 将离心管从磁力架上取下, **加入 1.25 mL IRD Bufferr/异丙醇预混液, 以最大速度涡旋 1min, 重悬 Mag-Bind[®] Particles RQ;**
9. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清, 磁珠完全吸附于管内一侧, 小心吸除上清;
10. 将离心管从磁力架上取下, **加入 1.25 mL VHB Buffer (已加无水乙醇正确稀释), 以最大速度涡旋 1min, 重悬 Mag-Bind[®] Particles RQ;**
11. **【非常重要】把 VHB Buffer/Mag-Bind[®] Particles RQ 混合液全部转移到一个新的 1.5 mL 离心管中, 高速涡旋 1min. 弃除旧离心管;**
12. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清, 磁珠完全吸附于管内一侧, 小心吸除上清;
13. 将离心管从磁力架上取下, **加入 1.25 mL VHB Buffer (已加无水乙醇正确稀释), 以最大速度涡旋 1min, 重悬 Mag-Bind[®] Particles RQ;**
14. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清, 磁珠完全吸附于管内一侧, 小心吸除上清;
15. 将离心管从磁力架上取下, **加入 1.25 mL 70%乙醇 (自备), 以最大速度涡旋 1min, 重悬 Mag-Bind[®] Particles RQ;**

16. 将离心管置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清，磁珠完全吸附于管内一侧，小心吸除上清；
17. 将离心管继续放置在磁力架上，打开管盖等待 1min，让液体全部流到底部，如管盖管底有残留的液滴，请用移液枪完全吸弃。室温静置 10min 干燥 Mag-Bind[®] Particles RQ；
18. 将离心管从磁力架上取下，加入 50-100 μL Endo-free Water 至管中，以最大速度涡旋 3min，打散 Mag-Bind[®] Particles RQ 洗脱 DNA；
19. 将离心管放置在磁力架上，直至 Mag-Bind[®] Particles RQ 被完全吸附；
20. 将纯化好的 DNA 上清液转移到一新的 1.5 mL 离心管中放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

★ 提取步骤——24 孔深孔板提取

1. 将 ≤ 50 mL 大肠杆菌接种在含有 LB 或 ≤ 10 mL TB 培养基的培养瓶中（培养基的体积不高于培养瓶的 1/4），37 $^{\circ}\text{C}$ 下摇晃培养 12-16 小时后转移到 50 mL 离心管内（自备）；
注意：细胞的密度 OD600 建议不要超过 3.0，强烈建议使用 *endA*-基因型大肠杆菌菌株，例如 DH5 α [®] 和 JM109[®] 两种菌株。
2. 在室温下以 4,000 rpm 转速离心 10min，收集菌体；
3. 弃除上清培养基，加入 2.5 mL Solution I，涡旋振荡使细菌完全分散；
注意：Solution I 使用前必须加入 RNase A，如果菌液未能完全悬浮则会影响产物的质量。
4. 将 2.5 mL 重悬细胞转移到 24 孔板(自备)中，在摇床上室温 1,250 rpm 转速摇 10 分钟；
5. 往重悬液中加入 2.5 mL Solution II，在摇床上室温 400 rpm 转速摇 3min；
注意：避免剧烈摇晃裂解液，静置时间不应超过 5min，否则会使染色体 DNA 断裂而使质粒纯度降低。静置时间过长可能会导致质粒 DNA 断裂（当使用完 Solution II 以后，须盖紧瓶盖保存）。
6. 根据下表配置 N3 Buffer 和 Mag-Bind[®] Particles LC，配置好的试剂需要在 72 小时内用完；

注意: 试剂盒内不提供 Mag-Bind® Particles LC (货号#MBPLC-05), 请按需单独购买。

试剂	加入量/样	每 24 份反应加入总量
N3 Buffer	2 mL	52.8 mL
Mag-Bind® Particles LC	600 μ L	15.8 mL

*每块 24 深孔板加入的试剂总量已按 10% 预算损耗体积。

- 加入 2.6 mL N3 Buffer 和 Mag-Bind® Particles LC 的混合液, 以 800 rpm 转速摇 3min, 直至形成白色絮状沉淀;
- 将深孔板置于磁力架上室温等待至溶液变得完全澄清, 磁珠完全吸附于板底;
- 转移 5.5 mL 上清至新的 24 孔深孔板中, 避免转移到沉淀;
- 加入 5.5 mL IRD Bufferr/异丙醇预混液和 200 μ L Mag-Bind® Particles RQ;
注意: 请按第 2 页 “实验前指引” 配置 IRD Buffer/异丙醇预混液, 需现配现用, 切勿原瓶稀释!
- 可把深孔板放在核酸提取仪上进行后续的提取, 请联系 Omega Bio-tek 的技术工程师获取程序说明。

★ 产品信息卡



更多详情，请扫描左方二维码获取原文说明书

中文翻译仅供辅助阅读



中国总代理：广州飞扬生物工程有限公司

技术支持：020-32051125

企业 QQ：800848200（人工客服在线）

中文网站：omegabiotek.com.cn

如需查询代理商名录，请关注“飞扬生物”微信号获取

售后保障服务说明

为确保您所使用的试剂为正品来源，请从使用单位所在地指定代理商处购买 Omega bio-tek 产品。由其他渠道购买或任一标签信息(应包括货号、条形码、完整 Lot 号、失效日期)缺失的试剂盒，我司恕不提供任何质量保证及售后服务。