

### 【产品概述】

本试剂盒结合经典的 SDS 碱裂解法和先进的基于磁珠的核酸纯化技术，用于灵活、快速地对 1-50 mL 大肠杆菌菌液进行质粒 DNA 提取。博岳自产的高性能纳米磁珠可以特异性结合质粒 DNA，通过洗涤步骤最大程度去除蛋白质等杂质，获得高纯度质粒 DNA 用于各种常规的分子生物学实验，如酶切、扩增、测序、连接和转化等试验。

质粒 DNA 得率受质粒大小、拷贝数量、细菌株系、生长状态等影响而有所不同。典型情况下，本试剂盒可以从 1-5 mL 过夜培养的大肠杆菌中纯化得到 5-50 μg 高拷贝的质粒 DNA。本试剂盒也可以用于适配全自动核酸纯化设备进行高通量质粒纯化。

### 【产品组分】

组分	M1PD01-01 (50 次*)	M1PD01-02 (200 次*)
RNase A	0.3 mL	1.2 mL
溶液 I**	10 mL**	40 mL**
溶液 II	10 mL	40 mL
溶液 III	10 mL	40 mL
洗涤液***	12 mL***	50 mL***
洗脱液	5 mL	20 mL
磁珠	0.5 mL	2×1 mL

\* 提取次数按每次纯化 1-5 mL 菌液进行计算。提取更大体积菌液时试剂用量增加，提取次数相应减少。

\*\* 首次使用时，将 RNase A 全部加入溶液 I 并充分混匀。该混合液需 2-8°C 保存，有效期 6 个月。

\*\*\*首次使用时，按照说明书及瓶身提示在洗涤液瓶中加入指定体积的无水乙醇：M1PD01-01 需加入 48 mL 无水乙醇；M1PD01-02 需加入 200 mL 无水乙醇。

### 【储存和运输】

常温运输，RNase A 收到后 -20°C 保存，其余组分室温（15-25°C）保存。建议将磁珠保存于 2-8°C 以延长有效期。产品有效期 1 年。



## 【注意事项】

- 自备无水乙醇、异丙醇。
- 自备磁力架、水浴锅或金属浴、涡旋仪，以及 1.5/2.0 mL 无核酶离心管用于处理 1-5 mL 菌液，或 10/15 mL 无核酶离心管用于处理 5-50 mL 菌液。
- 溶液 I 使用前请加入 RNase A (将试剂盒提供的 RNase A 全部加入溶液 I)，混匀后置于 2-8°C 保存，可稳定保存 6 个月。
- 溶液 II 遇低温易析出，使用前先检查是否有晶体析出。如有晶体析出，可置于 37°C 加热至完全溶解，混匀后使用。使用后应立即盖紧盖子。
- 洗涤液在第一次使用前请加入指定体积的无水乙醇（乙醇终浓度 80%），充分混匀并在瓶上做好标记。
- 磁珠悬液在静置后会发生沉降，使用前充分涡旋或震荡混匀。
- 可以使用去离子水、TE 溶液代替洗脱液进行洗脱，使用去离子水时其 pH 不应低于 7。
- 处理低拷贝质粒时，可适当增加菌液体积，并按比例扩大溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的用量。
- 实验操作时应注意做好个人防护，包括穿戴实验服、手套、护目镜等，不要直接接触试剂。

## 【试剂用量】

以含高拷贝质粒的 DH5 $\alpha$  菌液为例，不同菌液体积的推荐试剂用量如下：

组分	1-5 mL	5-20 mL	20-50 mL
溶液 I (已加入 RNase A)	200 $\mu$ L	1 mL	2 mL
溶液 II	200 $\mu$ L	1 mL	2 mL
溶液 III	200 $\mu$ L	1 mL	2 mL
磁珠	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
洗涤液 (已加入无水乙醇)	600 $\mu$ L	2 mL	5 mL
洗脱液	100 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1 mL
离心管 (自备) *	1.5 或 2.0 mL	10 或 15 mL	10 或 15 mL

\* 可以采取多次离心的方式，将细菌收集在同一个离心管中。

2



## 【实验操作】

以下操作以处理 1-5 mL 菌液为例，其他体积菌液操作方式基本相同，试剂用量参考上表。

1. 将过夜培养的菌液 12000 rpm 离心 1 min 收集菌体，离心后尽量吸除上清。菌液较多时可以通过多次离心的方式将菌体收集到同一个离心管中。
2. 向离心管中加入 **200  $\mu$ L 溶液 I**（确认已按要求加入 RNase A），使用移液器吹打或涡旋仪振荡使菌体彻底悬浮。注意：保证菌体彻底重悬对提高质粒 DNA 得率和质量至关重要。
3. 向离心管中加入 **200  $\mu$ L 溶液 II**，温和地上下颠倒混匀 6-8 次，室温放置 3 min 或直至溶液透明清亮。注意：不要剧烈振荡，避免基因组 DNA 污染；放置时间不超过 5 min，避免质粒受到破坏；如果溶液未变得清亮，可能由于菌体过多裂解不彻底，应减少菌体量；溶液 II 使用后应迅速盖紧瓶盖。
4. 向离心管中加入 **200  $\mu$ L 溶液 III**，立即温和地上下颠倒 6-8 次至形成白色絮状沉淀，然后  $\geq 12,000$  rpm ( $\geq 13,400 \times g$ ) 离心 5-10 min。离心后上清应为澄清状，若漂有微小白色沉淀，不影响后续操作。
5. 转移上清到新的 1.5 mL 离心管（自备）中，尽量不要吸出底部沉淀。
6. 在离心管中加入**上清体积 1/3 的异丙醇**（每 600  $\mu$ L 上清加入 200  $\mu$ L 异丙醇）和 **10  $\mu$ L 磁珠**（使用前充分涡旋混匀），充分颠倒混匀或点触涡旋混匀，室温孵育 3-5 min，期间可以混匀数次。
7. 将离心管置于磁力架上静置 1-2 min，直至所有磁珠被吸附，溶液澄清，吸弃上清。
8. 加入 **600  $\mu$ L 洗涤液**（确保已按要求加入规定体积的无水乙醇），短暂涡旋混匀后放回磁力架，静置 1-2 min 直至所有磁珠被吸附，溶液澄清，吸弃上清。
9. 重复以上步骤，再次洗涤磁珠。
10. 保持离心管在磁力架上，室温敞口晾干磁珠 3-5 min，去除乙醇残留。静置期间若离心管底部有多余液体，可用移液器将其吸出。也可以将离心管置于超净工作台吹风或者置于 50°C 烘箱加热，以加速乙醇挥发。注意：应使乙醇尽量挥发干净，否则可能会影响质粒 DNA 纯度（OD260/OD230 比值）；同时不能使磁珠过分干燥，否则可能会显著降低质粒 DNA 得率。



- 从磁力架上取出离心管，加入 **50-100  $\mu$ L 洗脱液**，充分吹打或涡旋混匀，静置 2 min。注意：可以使用 65°C 预热的洗脱液以增加质粒洗脱效率；或者将离心管置于 65°C 孵育 5-10 min，期间吹打或涡旋混匀数次，以获得最佳洗脱效率。
- 将离心管重新置于磁力架上，静置 1-2 min 确保所有磁珠被吸附，转移**洗脱液**到新的无核酶离心管中。提取的质粒可以直接用于下游应用或者 -20°C 保存备用。

### 【常见问题及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
质粒 DNA 产量低	细菌未充分裂解	细菌成团会裂解不充分从而降低产量，确保菌体在溶液 I 中充分重悬，加入溶液 II 后需要温和颠倒混匀
	结合不充分	加入磁珠后确保混匀，使磁珠处于悬浮状态
	操作过程中磁珠丢失	结合和洗涤过程中尽量减少磁珠的损耗。在洗脱时，确保磁珠悬浮在洗脱液中
	洗脱时间太短	加入洗脱液后充分悬浮磁珠，延长洗脱时间或于 65°C 孵育
	低拷贝质粒	得率会因质粒载体拷贝数的差异有明显的波动。低拷贝质粒可增加菌液量，同时比例增加溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的用量。
	大质粒 (>10 kb)	应加大菌液使用量，同时按比例增加溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的用量。
	溶液 II 保存不当失效	溶液 II 使用后，应立即盖紧盖子确保密封；使用新鲜配制的 200 mM NaOH，1% SDS 溶液重新提取
	溶液 II 析出	溶液 II 低温时易析出，应 37°C 加热至完全溶解，混匀后使用
	菌液保存不当	培养细菌前可先划线或涂布平板活化，以稳定质粒产量
	宿主菌株差异	宿主菌株不同也会影响质粒 DNA 的产量，建议使用 end A 大肠杆菌菌株，如 DH5 $\alpha$ 、TOP10 及 XL10 等
基因组污染	裂解操作不当	加入溶液 II、溶液 III 后，必须温和颠倒混匀；样本裂解时间不要超过 5 min
纯度低	乙醇有残留	吸弃上清时，将管底的液体吸净，若管壁存在液体挂壁，可短暂离心后将离心管放入磁力架上再次吸净液体
	产物中吸入磁珠	确保所有磁珠吸附在管壁时吸取上清，若不小心吸入磁珠，可将上清放入管中重新吸磁、取上清
RNA 残留	RNase A 活性下降	已加入 RNase A 的溶液 I 长时间室温放置可能会导致酶活下降，使用后应及时放回 2-8°C
	菌液体积过高	由于菌体数量过多，导致溶液 I 中 RNase A 不足以消化菌体中的 RNA，建议减少菌液体积

