



版本号: 202409V01

# Mag-Beads 96 Well Plasmid DNA Mini-Preps Kit

## 磁珠法高通量质粒小量提取试剂盒

Cat. No. CW3083

储存条件: 室温 (15-30°C)

### 产品简介

本试剂盒包含独特的缓冲液体系与纯化磁珠, 在核酸自动提取仪的配合下, 可实现高通量快速纯化 1~5 mL 菌液的质粒DNA。制备的质粒样品适用于一代测序、载体构建、PCR 和 qPCR 等下游应用。

### 产品内容

Component	CW3083S 96 preps	CW3083L 50x96 preps
Buffer P1	30 mL/瓶	3x360 mL/瓶
Buffer P2	30 mL/瓶	3x360 mL/瓶
Buffer P3	30 mL/瓶	3x360 mL/瓶
RNase A (100 mg/mL)		3x720 $\mu$ L /管
RNase A (10 mg/mL)	450 $\mu$ L/管	
CWRed -L		3x360 $\mu$ L /管
CWRed	300 $\mu$ L/管	
Plate 1 (样本板)	1个	50个
Plate 2 (磁珠+漂洗液1)	1个	50个
Plate 3 (漂洗液2)	1个	50个
Plate 4 (洗脱液)	1个	50个
3083磁棒套	1个	25x2个/袋

## 自备耗材

用于微生物培养以及细胞收集的仪器或耗材,包括样本过滤板、37 °C 培养摇床、振荡混匀仪、离心机和全自动核酸提取仪等。

## 注意事项

1. 所有组分可在干燥、室温 (15-30 °C) 环境中稳定保存 1 年,加入 RNase A 的 Buffer P1 置于 2-8 °C 可稳定保存 6 个月。
2. Buffer P1 在使用前首先加入 RNase A 和 CWRed (每瓶P1溶液加入 1 管 RNase A 和 1 管 CWRed / CWRed-L), 混匀待用,或置于 2-8 °C 长期保存。使用前需在室温中放置一段时间,恢复至室温后使用。
3. 使用前请先检查 Buffer P2、Buffer P3 溶液是否出现结晶或沉淀,若发生结晶或沉淀现象,可在 37 °C 水浴至恢复澄清。
4. Buffer P2 和 Buffer P3 溶液含有刺激性化学物质,请戴手套操作,使用后应立即旋紧瓶盖。
5. 细菌培养浓度、菌株种类、质粒大小、质粒拷贝数等因素均会影响质粒得率和纯度。

## CWRed指示剂使用说明

CWRed/CWRed-L 试剂是一种颜色指示剂,用以指示整个操作的规范性,对下游实验与操作人员健康无负面影响。客户根据需求自主选择是否添加。

添加 CWRed/CWRed-L 的P1溶液呈红色;加入 P2 之后,溶液变为紫色均相,表明细胞已充分裂解;再加 P3 溶液之后,溶液转变为黄色均相,表明中和复性反应充分。

## 操作步骤

### 一、手动操作

#### 1. 菌液样本处理:

在 96 孔培养板中,过夜培养含目的质粒的大肠杆菌菌液。

**推荐:** 96 孔板培养菌体量为 750~1500  $\mu$ L;富营养培养基更有利于细菌生长并获得更高的质粒得率。

- 3500~4000 rpm 离心 5 min, 倒掉培养板上清液, 轻甩几次培养板, 倒置于吸水纸上 30~60 sec, 尽量除净残留液体; 若菌液浓度低, 可重复收集菌体细胞。

**注意:** 残留液体会影响后续质粒的提取纯化效果。

- 加入 200  $\mu$ L Buffer P1, 置于涡旋振荡摇床上 (推荐 IKA MS3 或 ThermoMixer C 混匀仪), 1000~1200 rpm 涡旋振荡混匀 3~5 min, 至菌体细胞充分悬浮。

**注意:** Buffer P1 使用前加入 RNase A 和 CWRed/CWRed-L, 菌体沉淀需完全悬浮于 Buffer P1 溶液, 且红色悬浮液中无肉眼可见菌体斑块。

- 加入 200  $\mu$ L Buffer P2, 置于涡旋振荡摇床 (推荐 IKA MS3 或 ThermoMixer C 混匀仪) 上, 500~600 rpm 混匀 30~60 sec (涡旋混匀至呈现澄清、均一的紫色溶液, 即为裂解完全, 若用枪头蘸取溶液可见拉丝现象; 若溶液未呈均一紫色, 则裂解不完全);

**注意:** 振荡裂解过程中, 尽量缩短质粒 DNA 暴露于碱性溶液中的时间, 应在菌体细胞裂解完全后立即进行下一步操作。

- 加入 200  $\mu$ L Buffer P3, 置于涡旋振荡摇床 (IKA MS3 或 ThermoMixer C) 上, 800~1200 rpm 振荡混匀 30~90 sec (至溶液中有肉眼可见絮状漂浮物, 且溶液为澄清、均一的黄色, 无紫色残留, 即为中和复性完全)。

**注意:** 振荡混匀过程中, 严格控制振荡频率, 避免发生液体出孔而导致发生交叉污染, 振荡混匀后应尽快上机提取。混匀方式也可用封板膜封闭 96 深孔板, 颠倒混匀, 瞬时离心收集液体至孔底, 实现步骤 3 至 5 的涡旋振荡混匀。

- 将步骤 5 得到的黄色溶液 (包括杂质) 全部转入“样本过滤板 (客户自备)”中, 在负压抽滤装置上依次放入“Plate 1 (样本板)”和“Filter Plate (样本过滤板)”, 打开抽气泵至 Filter Plate 中的溶液全部进入“Plate 1 (样本板)”中, 关闭抽气泵, 取出“Plate 1 (样本板)”, 进入自动化提取阶段。

**注意:** Plate 1 (样本板) 瞬时离心收集液滴至孔底, 小心撕去铝箔封口膜; 正压过滤装置也可以替代负压抽滤装置实现同等的过滤去除杂质的效果, 详细信息可咨询本公司。

## 二、自动化提取

1. 取出预封装深孔板，颠倒混匀数次使磁珠重悬，瞬时离心收集孔板中试剂及磁珠集中到孔板底部（可使用孔板离心机 500 rpm 进行离心 1 min），使用前小心撕去铝箔封口膜，避免孔板振动，防止液体溅出。
2. 将磁棒套插入磁棒套卡槽中。
3. 将装有上述步骤制备的含质粒的菌体裂解滤液的Plate 1（样本板）放入仪器的板位 1，其他预封装试剂按照深孔板标签所示依次放入对应板位。
4. 选择程序“CW3083”，程序运行约 20 min 结束，将板位 4 中的质粒样品取出，甩板机上离心收集洗脱液于孔底，用封口膜封好并保存于 -20 °C 备用或继续下游实验。
5. 程序请参考下表设置

板位	释放	名称	等待	震动	振幅	强度	循环	磁吸	体系 /μL	温度
	磁珠		时间	时间			次数	时间		
2	否	取磁珠	0	0	/	/	1	5s	900	室温
1	是	结合	0	30s	中	中	1	0	900	室温
1	是	结合	0	60s	低	低	1	0	900	室温
1	是	结合	0	15s	中	中	1	0	900	室温
1	是	结合	0	45s	低	低	1	0	900	室温
1	是	结合	0	15s	中	中	1	0	900	室温
1	是	结合	0	45s	低	低	1	0	900	室温
1	是	结合	0	15s	中	中	1	0	900	室温
1	是	结合	0	45s	低	低	2	5s	900	室温
2	是	漂洗	0	90s	强	强	1	5s	750	室温
3	是	漂洗	0	90s	强	强	1	5s	800	室温
4	是	洗脱	300s	300s	中	中	2	10s	100	65°C
2	是	弃磁珠	0	10s	中	中	/	/	/	室温