



# 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

### 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 1~4 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。

### 保存条件

室温 (15-30℃)

### 产品内容

| Component           | CW3083S<br>96 preps | CW3083L<br>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 μL /管            |
| RNase A (10 mg/mL)  | 1 mL/管              |                        |
| CWRed -L            |                     | 3x360 μL /管            |
| CWRed               | 300 μL/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                |

## 自备仪器和耗材

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、全自动核酸提取仪、真空泵和负压抽滤装置 (或用离心机代替)。

## 注意事项

1. 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。使用前需恢复至室温后使用。
2. 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, 请勿剧烈摇晃 Buffer P2 试剂瓶, 避免产生大量气泡。
3. 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。
4. 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。

2. 3500~4000 rpm 离心 5 min, 倒掉培养板上上清液, 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。

3. 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。

4. 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。

5. 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, 代替步骤 3 至 5 的涡旋振荡混匀。

6. 可选步骤:

A. 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。

B. 将步骤5的深孔板置于离心机上, 3000~4000 rpm 离心 10 min, 吸取孔内上清约 500  $\mu$ L 加入“Plate 1 (样本板)”对应孔位内, 进入自动化提取阶段。

**注意:** 1. 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, 防止板内液体溅出。

2. 离心后取上清应尽量避免吸取到过多沉淀, 大量沉淀会影响提取效果, 少量沉淀不影响提取结果。

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，其他预分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 ℃ 备用或继续下游实验。

5. 程序请参考下表设置

| 板位 | 释放磁珠 | 名称  | 等待时间 | 震动时间 | 振幅 | 强度 | 循环次数 | 磁吸时间 | 体系/μL | 温度  |
|----|------|-----|------|------|----|----|------|------|-------|-----|
| 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℃ |
| 2  | 是    | 弃磁珠 | 0    | 10s  | 中  | 中  | /    | /    | /     | 室温  |