质粒小量提取试剂盒（磁珠法）

本试剂盒适用于质粒的小量纯化。采用了传统的碱裂解法裂解菌体，裂解液中的质粒可与全顺性磁珠结合，经洗涤和洗脱后，得到高纯度的质粒 DNA。本试剂盒可以使用手动操作进行质粒 DNA 的提取，也可以经对自动化提取设备进行参数调试后，用自动化设备进行质粒的提取。经本试剂盒提取的 DNA 纯度高，可应用于分子克隆、PCR、酶切等分子生物学实验。

一、 试剂盒组成：

Cat.No.	EK03404	EK03405	EK03425	EK03450
制备次数	4 tests	50 tests	250 tests	500 tests
Magnetic beads	0.8 ml	10 ml	50 ml	100 ml
RNase A	10 μl	40 μl	200 μl	400 μl
Lysis buffer A1	2 ml	15 ml	75 ml	150 ml
Lysis buffer B1	2 ml	15 ml	75 ml	150 ml
Lysis buffer C1	2.5 ml	21 ml	105 ml	210 ml
Wash buffer A	2.8 ml	28 ml	135 ml	270 ml
Wash buffer M	2 ml	22 ml	60 ml×2	80 ml×3
Eluent solution	1 ml	5 ml	25 ml	50 ml

二、保存与运输：

1. 本试剂盒可以在室温下（15-25℃）运输和保存。若需长期保存，存放于 4℃，但有的缓冲液会出现沉淀，使用前需 37℃加热直至沉淀消失。
2. Lysis buffer A1 中加入 RNase A 后可于 4℃保存约 3 个月。
3. RNase A 可于室温下（15-25℃）保存 6 个月，长期保存需存入于-20℃。

三、使用前的准备事项：

1. 首次使用前，请将 RNase A 溶液全部加到 Lysis buffer A1 中，均匀混合后 4℃保存。
2. 首次使用前，按试剂瓶上指定的体积向 Wash buffer M 中加入无水乙醇。
3. 检测 Lysis buffer B1 中是否有沉淀，如果有沉淀请将试剂置于 37℃水浴直至沉淀消失，不可剧烈振荡 Lysis buffer B1，否则会产生大量气泡。
4. Lysis buffer B1 使用后，应立即盖紧盖子，避免试剂长间与空气接触。
5. Lysis buffer C1 使用前请于 4℃预冷。
6. 试剂中含有强碱及变性剂，操作时应佩戴手套等防护用品。

四、操作方法：

1. 大肠杆菌的培养。从平板培养基上挑选单菌落接种到 1-4ml 的含有抗生素的液体培养基中，37℃过夜培养；（培养 12-16 小时为宜，超过 16 小时细菌将难以裂解，质粒得率也会随之降低。）
2. 取 1-4ml 的过夜培养菌液，12000rpm 离心 2 分钟，弃上清；
3. 用 250μl Lysis buffer A1 （含 RNase A）充分悬浮细菌沉淀；

   注：不要残留细小菌块，可以使用旋涡振荡器等剧烈振荡使菌体充分悬浮。
4. 加入 250μl Lysis buffer B1 轻轻上下翻转混合 5-6 次，使菌体充分裂解，形成透明溶液；

   注：轻轻颠倒混合，不可剧烈振荡，此步骤不宜超过 5 分钟。
5. 加入 350μl 的 4℃预冷的 Lysis buffer C1，轻轻上下翻转混合 5-6 次，直至形成紧实絮块状，然后室温静置 2 分钟；
6. 室温 12000rpm 离心 10 分钟，取上清，放入新的干净的 1.5ml 离心管；

   注：此时 4℃离心不利于沉淀沉降。
7. 向步骤 6 上清中加入 200μl Magnetic beads，室温结合 3 分钟，其间每 1 分钟振荡混匀 20 秒；

   注：Magnetic beads 在每次吸取之前都要充分混匀，且吸取的磁珠必须一次使用，不可对一次吸取的磁珠进行分液。
8. 将离心管放置在磁力架上，静置 1 分钟，待溶液澄清后，弃上清；
9. 加入 500μl Wash buffer A，充分振荡混匀。将离心管放于磁力架上，静置，待溶液澄清后，吸除上清；
10. 加入 700μl Wash buffer M，充分振荡混匀。将离心管放于磁力架上，静置，待溶液澄清后，吸除上清；

    注：确认 Wash buffer M 中已经加入指定体积的无水乙醇。
11. 重复步骤 10 二次。尽量吸干上清，室温或 37℃放置 5-10 分钟，待乙醇完全挥发；
12. 向磁珠中加入 50 -100μl Eluent solution，室温结合 3min，其间每隔 1 分钟振荡 20 秒；

    注：加入 Eluent solution 前，先将 Eluent solution 加热至 50℃，有助于更好的洗脱质粒 DNA。
13. 将离心管放于磁力架上，待溶液澄清后，吸取上清，转移到干净的离心管中。