

质粒小量提取试剂盒（自动化磁珠法）

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。本试剂盒经对提取设备进行参数调试后，使用 NP968 型核酸提取仪进行质粒的提取。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、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℃，Lysis buffer B1 会出现沉淀，使用前需 37℃ 加热直至沉淀消失。
2. 预装深孔板由于运输等问题，内装试剂可能会吸附到封口膜上，使用前请将深孔板置于离心机内 200rpm 离心 10-15 秒，即可将试剂甩落至孔底。
3. Lysis buffer A1 中加入 RNase A 后可于 4℃ 保存约 3 个月。
4. RNase A 可于室温下（15-25℃）保存 6 个月，长期保存需保存在 -20℃。

二、使用前的准备事项：

1. 请仔细阅读 NP968 型核酸提取仪的说明书，如需自行编辑或修改程序，请按说明书上的步骤操作。
2. 首次使用前，请将 RNase A 溶液全部加到 Lysis buffer A1 中，每瓶 Lysis buffer A1 溶液加入 1 管 RNaseA 溶液，均匀混合后 4℃ 保存。
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。

三、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，可以使用漩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 350 μl 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（如使用 2.2ml 深孔板进行上述裂解步骤，也可使用 6000g 离心 15min），同时将 NP968 核酸提取仪开机，初始化机器。离心结束后取上清，加入到预装深孔板第 1 列或是第 7 列的样品孔中；

注：此时 4℃ 离心不利于沉淀沉降。

7. 将深孔板放入 NP968 核酸提取仪，确认深孔板上的缺口向外；
8. 将搅拌套插入搅拌套架；

注：搅拌套架上没有放置搅拌套时请不要运行程序，否则会污染腐蚀磁力棒。

9. 关闭实验舱门，直接选择要运行的程序文件，点击屏幕上“运行”按钮运行程序；

注：如需自行设计或是编辑程序，请按说明书操作，也可参考下表进行设计或是修改程序。

步骤	孔位	名称	等待时间	混合时间	磁吸时间	混合速度	体积	温度状态	温度
1	1	Binding	0	1	60	中	900	关闭	0
2	2	Wash A	0	1	60	中	500	关闭	0
3	3	Wash M	0	1	60	中	700	关闭	0
4	4	Wash M	0	1	60	中	700	关闭	0
5	5	Wash M	0	1	60	中	700	关闭	0
6	6	Elute	1	2	120	中	50	洗脱加温	65
7	3	Discard	0	1	0	中	500	关闭	0

10. 待程序运行完毕，机器发出间断长鸣声提示音后，打开实验舱门，将深孔板取出；

注：在程序运行过程中，如果没有异常或是没有试验需要，请不要打开实验舱门，如果需要打开，请先暂停运行程序。

11. 从第 6 列和第 12 列洗脱孔中吸出溶液，即为抽提得到的质粒溶液。

注：如果发现洗脱孔中有磁珠残留，请将深孔板放置于磁力板上静置 1min 后，再小心的吸出不含磁珠的质粒溶液。