

## iMag™质粒提取（磁珠）试剂盒说明书

### 【产品组成】

产品名称	货号	规格
iMag™质粒提取试剂盒	BG30101S	384 R
	BG30101M	4000 R
	BG30101L	40000 R

### 【产品说明】

iMag™高通量质粒提取试剂盒采用磁分离技术，能够从大肠杆菌中分离纯化高质量的质粒 DNA。该试剂盒首先采用碱裂解法将细胞裂解，然后通过改变条件使磁珠可逆的结合和释放质粒 DNA，从而达到提取质粒 DNA 的目的。与传统柱吸附或真空过滤的方法相比，磁珠分离 DNA 更易于进行自动化操作。经该试剂盒纯化得到的质粒 DNA 可直接用于荧光 DNA 测序（包括毛细管电泳）、PCR 扩增、转化、限制酶消化、体外转位子插入等多种生物学实验。

该试剂盒纯化质粒 DNA 的量会随着细菌类型、载体类型和质粒大小有所变化，一般来讲，使用 800 μL 菌液提取质粒时，高拷贝质粒可以获得 500 ng-2 μg DNA，低拷贝的质粒可以获得 300 ng-1 μg DNA。

iMag™试剂盒是专门为配套自动化工作台开发的大规模、高通量的质粒 DNA 提取试剂盒，可以适用于大多数自动化仪器，也可以人工进行少量质粒的提取。

### 【试剂盒组分】

iMag Solution R1:

重悬液：可以室温 12 个月，加入 RNase A 后需 4°C 保存，保存时间为 6 个月。

iMag Solution L2:

裂解液：室温储存（15-25°C），温度过低会有白色沉淀产生。若出现白色沉淀，请勿直接使用，可在 37°C 温浴一下，待溶液澄清后使用。

iMag Solution N3:

中和液：室温储存（15-25°C）

iMag Solution M4:

质粒结合液：4°C 储存，切勿冷冻，使用时请将磁珠混匀。

RNase A:

-20°C 储存，加入 iMag Solution R1 中，降解菌体中的 RNA。

所有组分可在指定的条件下保存 1 年（加入 RNase A 的 iMag Solution R1 在 4°C 可保存 6 个月。）

### 【自备仪器与试剂】

试剂	仪器
100%异丙醇 70%乙醇 洗脱液 EB (10 mM Tris-HCl, PH 8.0) 或去离子水	96 孔 1.1 mL 培养板 96 孔 1.1 mL 培养板 96 孔 300 μL 圆底板 96 孔板配套磁力架 (推荐使用 Agencourt SPRIPlate® 96R ring magnetic plate)

### 【操作步骤】

1. 吸取 800 μL 细菌培养基到每个 1.1 mL 的培养板中。
2. 每孔挑取一个菌落克隆进行过夜培养。
3. 用透气性的封膜封住培养板，37°C 300 rpm 培养 18 h。注：不建议克隆生长时间超过推荐时间。培养时间太久，细胞会死亡，影响试剂盒提取质粒 DNA 的效果。
4. 将菌液 4000 rpm 离心 10 min，获得菌体沉淀。

- 离心后，去除封膜，倒置培养板除去培养基。用纸巾吸去残留的的培养基。用纸巾吸去培养基的过程中要温和，避免泛起细胞沉淀，如果想要在本步骤停止实验，用封膜封住培养板，贮存在-20°C或-80°C。以下为质粒提取的具体步骤，可同时参照后面提取流程示意图以便于理解。
- 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  Solution R1，通过涡旋震荡或移液器吹打的方式彻底重悬细胞沉淀。细胞沉淀要完全重悬混匀，避免细胞沉淀颗粒存在。
- 加入 100  $\mu\text{L}$  Solution L2 溶液，轻轻混合，样品裂解时间为 5 min。以 300-600 rpm 的转速震荡 5 min；或者轻轻地用移液枪混 2 次，然后静置 5 min 使细胞完全裂解。不要用力吹打样品，防止片段较大的质粒断裂，裂解时间不要超过 10 min。

Solution L2 是碱性溶液，操作时请带上手套。

- 加入 100  $\mu\text{L}$  Solution N3 溶液，轻轻混合，样品中和 10 min。以 300-600 rpm 震荡样品 10 min 使中和完全。也可以用移液枪轻轻混匀溶液，避免在顶部产生絮状沉淀。

操作时请带上手套。Solution N3 溶液能够中和 Solution L2 裂解溶液，沉淀蛋白以及细胞碎片，形成白色絮状沉淀。

- 溶液中和反应后，样品以 4700 g 转速离心 20 min。
- 将 110  $\mu\text{L}$  上清液转移到 300  $\mu\text{L}$  圆底微孔板中。该过程是最关键的一步。上清液最佳状态是不含沉淀物。离心后，样品要尽快转移，防止沉淀分散。
- 加入 10  $\mu\text{L}$  Solution M4 溶液和 80  $\mu\text{L}$  100% 异丙醇，均匀混合十次。Solution M4 是一个含有磁珠的质粒结合缓冲液。加入磁珠和异丙醇后，样品需立即混匀，否则磁珠很容易从溶液中析出。如果震荡样品而不是用移液器混匀，可能导致质粒产量降低。

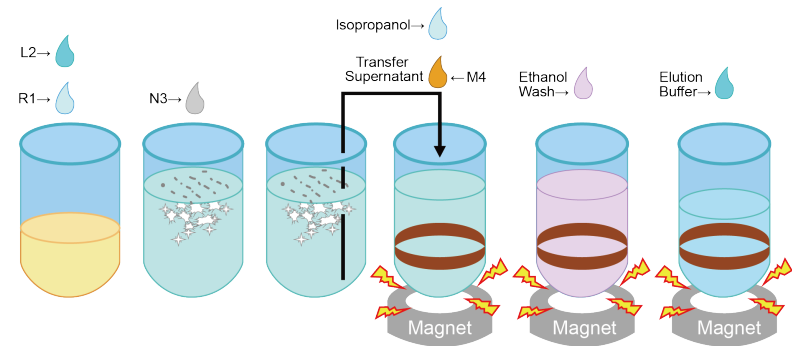
异丙醇的最优浓度是总体积的 40%。如果你转移的上清量高于或低于指定量，应该按比例增加异丙醇的量。

- 将微孔板放置于磁力架上，磁性吸附 15 min。吸附完成后，上清液的应当是澄清的，磁珠应当在底部形成一个圆环。有时上清液偏棕色，但溶液还是澄清的。
- 保持微孔板在磁力架上，用移液器吸去上清液。吸取过程中将吸头垂直插入管底，不要接触磁珠，若引起磁珠混乱，则需要吸附

- 更长时间后才能移去上清液。要尽量吸取干净，同时移去的液体中不要含有磁珠。
- 继续保持微孔板在磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  70% 乙醇，静止 30 s 后再次弃去上清液，重复该操作 2 次，总共洗 3 次。最好使用当天配置的 70% 的乙醇。如果乙醇的浓度小于 70%，部分质粒可能被会流失。洗脱过程尽量不要打散磁珠。
- 室温或 37°C 干燥，直到所有乙醇蒸发(大约 30 min)。
- 加入 40  $\mu\text{L}$  洗脱液 EB 或去离子水，37°C 孵育 5 min，震荡 30 s 溶解样品。尽管洗脱液 EB 或去离子水溶解磁珠中 DNA 时无需将磁珠返回到溶液中，但洗脱液必须能覆盖到磁环上的所有磁珠，避免 DNA 的流失；对于长期储存的样品来说，需要将洗脱后质粒溶液进行转移。在磁力架上吸附 1-3 min 后，将上清吸出，转移到新的 96 孔板上。

注意：

单个样品的操作，请根据以上步骤并配以合适的离心管和磁力架进行操作即可。



质粒提取流程示意图