



08-07

Nucleic Acid Purification Kit
MagExtractor-Plasmid-
(Code No. : NPK – 300,301)

使用说明书

研究用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

[1] 前言	1
[2] 使用前须知	1
[3] 试剂盒中所包含的物品	2
[4] 操作程序	2
1. 试剂盒以外所需要的其他物品	2
(1) 试剂	2
(2) 器具・器材	3
2. 抽提流程	3
3. 宿主菌的培养	3
4. 集菌	4
5. 试剂的制备	5
6. 使用MFX-2000 抽提Plasmid DNA的方法	5
(1) 操作程序的选择	5
(2) 加温block, 回收block的温度设定*1	7
(3) 附带专用过滤器的tip头设置	7
(4) 专用试管的设置	8
(5) 试剂的设置	8
(6) 样品的前处理及其设置	11
(7) 抽提开始	12
(8) 样品回收	12
(9) 通过手动法抽提plasmid DNA的方法	12
[5] 一般样品的分析	14
(1) A260, A280, A320 的测定	14
(2) 电泳	14
(3) DNA 测序	15
[6] 疑难解答	16
1. 使用MFX-2000 的场合	16
2. 使用手动操作的场合	16

【 注意 】

本试剂盒中所包含的试剂都是研究用试剂。请不要用于诊断，临床等场合。
在使用本试剂盒的时候，请严格遵守实验室的基本注意事项，并注意安全。

[1] 前言

MagExtractor -Plasmid-利用在 Chaotropic（盐）试剂存在的情况下，核酸能吸附在硅胶表面的特性，进行 plasmid DNA 的抽提·纯化。磁性体使用的是封入的磁珠，所以能够利用永久磁石很容易地分离回收核酸。磁珠依据吸附条件，分别对蛋白质，DNA，RNA 等不同物质具有不同的吸附能力，所以能够简便地纯化核酸。本试剂盒除了作为用于全自动核酸抽提装置 MFX-2000 的试剂外，也可以作为手动抽提试剂盒来使用。

性能·特征

- 能够从大肠菌中抽提·纯化出 plasmid DNA
- 能够回收 3~6 μ g 的 plasmid DNA (50~150ng/ μ l)^{*1}，可用于转化，限制酶处理，DNA 测序反应等。
- 能在 10~15min 之内抽提出 plasmid DNA。
- 不使用苯酚、氯仿等危险溶液。
- 无需乙醇沉淀。

[2] 使用前须知

1) 注意

MagExtractor -Plasmid-准备了四种对应于 MFX-2000，二种对应于手动的操作程序。使用对磁珠不进行干燥处理的操作程序（手动操作程序 I 以及 MFX-2000 的”Speedy”和”Lowcost”等操作程序）所得到的回收液，需要注意以下几点。

- 对于限制酶及转化处理，可直接加以使用。
- 琼脂糖电泳时的 Loading Dye 必须使用本试剂盒附带的产品。使用一般的产品组分时，可能样品会无法沉淀。
- 当用于 DNA 测序时的模板时，乙醇会阻碍测序反应，可将回收液置于 1.5ml 试管内，保持试管打开状态加温至 78℃ 40min。（也可只加温处理必要的剂量。参考 13 页。）
- 为了不让乙醇混入回收液中，请使用手动操作程序 II（参考 12~13 页），

如果是 MFX-2000 的场合下，请使用”Dryup”或”Fullauto”等操作程序。

*¹ 从M109/pUC19 过夜培养液中进行抽提的场合。

[3] 试剂盒中所包含的物品

本试剂盒中含有能够进行 50 次 plasmid DNA 回收的试剂量。

13x 2ml...	吸附液（含有蛋白质变性剂）	4℃或者室温下保存
2ml.....	磁珠 I	4℃或者室温下保存
2ml.....	磁珠 II	4℃或者室温下保存
8ml.....	再悬浮液.....	4℃下保存
16ml.....	溶解液 I（含有蛋白质变性剂）	4℃或者室温下保存
8ml.....	溶解液 II（含有蛋白质变性剂）.....	4℃下保存
6.5ml.....	中和液.....	4℃或者室温下保存
6ml.....	溶出液.....	4℃下保存
1.1ml.....	5 x Loading Dye.....	4℃下保存

- 试剂如果沾在手或衣服上或使用后，请彻底用清水清洗。万一不慎进入眼睛，立刻用清水彻底清洗，然后去看医生。
- 溶解液 I 有时会产生析出物。请在室温~40℃下完全溶解后再使用。
- 溶解液 I，II 的混合液在室温下保存超过三个星期后请不要再使用。^{*1}溶解液 I，II 以外的试剂请在 4℃下保存。
- 使用本公司的核酸自动抽提装置 MFX-2000 的情况下，请在指定的瓶中注入必要的剂量，置于指定部位。详细方法请参考 MFX-2000 的使用说明书。

[4] 操作程序

1. 试剂盒以外所需要的其他物品

(1) 试剂

- 灭菌水（蒸馏水或者 milliQ 水经过高温高压湿热灭菌）
- 乙醇溶液（99.5%以上的特级品，使用手动法的时候用 70%的乙醇溶液）

(2) 器具・器材

- 微量移液器
- 微量移液器用的 tip 头

使用 MFX-2000 の場合，必须配备以下物品。

- 抽提专用试管 (Code No: MFX-301)
- 抽提专用 6 连试管 (Code No: MFX-302)
- 附带专用过滤器的 tip 头 (Code No: MFX-402)

*¹ 有时 plasmid DNA 的回收量及纯度会发生降低。

- 试剂设置用试管 (50ml 用, 15ml 用, 2ml 用*¹) 使用手动法の場合，必须配备以下物品
- 1.5ml 小型试管用的磁性台架 (商店有售)
- 漩涡混合器或者小型试管混合器
- 简易台式离心机 (12,000r.p.m.)

2. 抽提流程

MagExtractor -Plasmid-通过以下五个工序对 Plasmid DNA 进行抽提和纯化。

- ①集菌
- ②碱溶菌
- ③中和
- ④通过磁珠 I 去除菌体残渣
- ⑤通过磁珠 II 分解，纯化 Plasmid DNA

使用 MagExtractor -Plasmid-和 MFX-2000 时，上述的②～⑤可成为自动化操作。

3. 宿主菌的培养

培养含 Plasmid DNA 的大肠杆菌。培养基可使用和通过 LB, TB 等碱性 SDS 法等方法来抽提 Plasmid DNA 的时候同样的培养基。由于 Plasmid 的回收量受拷贝数量以及菌体数量影响，推荐使用使 MagExtractor -Plasmid-能够使回收量更加稳定的 MMI 培养基。使用 MMI 培养基的情况下，菌体量和 TB 的情况等同(JM109 / pUC18, 50 μg / ml 氨苄青霉素 9~110.D.)。

MMI培养基的配制方法

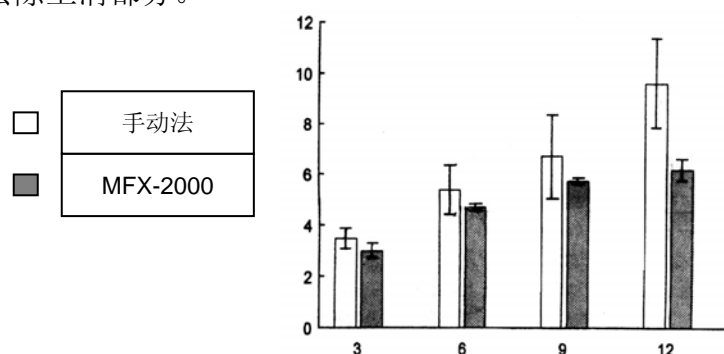
- |←蒸馏水 800ml
- |←13g Bacto trypton
- |←25g Bacto yeast extract
- |←8.5g NaCl
- |←4ml 丙三醇
- |←20ml 1M Tris-HCl, pH7.2
- | 加蒸馏水到 1000ml
- | 高温高压湿热灭菌

*1 50ml, 15ml试管请使用BECTON DICKINSON公司生产的BLUE MAX 2170,BLUE MAX 2196,2m 试管请使用本公司生产的 NO.72.693。

4. 集菌

使用 MagExtractor -Plasmid-能够处理的菌体量在手动法时是 12~13O.D., 使用 MFX-2000 时是 5~9 O.D.。根据菌体量和抽提方法的不同所引起的回收量的不同可以参考下图所示。在使用 MFX-2000 处理 10 O.D.以上的剂量时, 有可能会无法进行充分的搅拌 (pipetting), 使得纯度下降, 请务必注意。使用 angle rotor 对 1.5ml 试管进行集菌时, 菌体量请按照图 2 所示为标准。

- 请将培养液置于 1.5ml 试管中。
- 请用 12,000rpm 离心分离 2min。
- 请仔细去除上清部分。



菌体量 (O.D.)

图 1: 菌体量的不同引起的回收量的变化 (JM109 / pUC18, MMI 培养液)

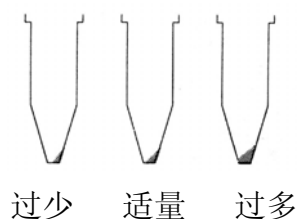


图 2：菌体量的标准

5. 试剂的制备

• 溶解液

请按照 4:1 (v:v) 的比例对试剂盒中的溶解液 I^{*1}, II 进行混合。请将此混合液在室温下保存, 三周后请勿继续使用^{*2}。通过手动法抽提的时候需要 150 μ g / 样品。使用 MFX-2000 的时候, 请参考第九页的表【各试剂的使用剂量标准】进行制备。

• 70%乙醇溶液

只有在使用手动法的时候使用。需要 1500 μ g / 样品。

6. 使用 MFX-2000 抽提 Plasmid DNA 的方法

在使用 MFX-2000 前, 请务必阅读 MFX-2000 的使用说明书。使用抽提程序中的”Dryup”或”Fullauto”程序时, 需要有加温的功能^{*3}。请使用标准式样 (加温, 简易保温功能 / Code No.: MFX-102) 或者是特殊式样 (加温, 电子冷却功能 / Code No.: MFX-103)。

(1) 操作程序的选择

MFX-2000 中准备了 4 种可供抽提 Plasmid DNA 用的操作程序。选择其中一个, 将其号码输入在液晶画面中。

- 一次操作只能选择其中一个操作程序。
- 下表的抽提时间不包含分装时间。实际的抽提时间根据样品不同会有所变化, 以下表的抽提时间 x 样品数 x 1.25 (小时) 为标准。

号 码	液晶画面的第 3 行显 示的内容	样品	抽提 时间	用途 ^{*1}	
				A	B
31	[Plasmid: Speedy]	再次悬浊液	10mi n	○	Δ ^{*2}
32	[Plasmid: Dryup]	再次悬浊液	15mi n	○	○
33	[Plasmid: Fullauto]	集菌后的菌体	16mi n	○	○
34	[Plasmid: Lowcost]	菌体抽提液	6min	○	Δ

^{*1} 用途A: 用于限制酶处理, 转化

用途 B: DNA 测序, 或使用回收液超过 50% 时的反应。

^{*2} 通过手动法进行去除乙醇的操作后便可以进行DNA 测序。

^{*1} 有析出物的场合, 请在室温 ~ 40℃ 中彻底溶解。

^{*2} Plasmid DNA 的回收量和纯度有时会降低。

^{*3} 如果只使用”Dryup”或”Fullauto”操作程序, 请使用基本样式的MFX-2000 (简易保温功能 / Code: MFX-101)。

• 操作程序 “31: Speed”

适用于限制酶处理以及转化用 Plasmid DNA 的制备。将再次悬浊液置于 MFX-2000 中, 大约在 10min / 样品下抽提出 Plasmid。

• 操作程序 “32: Dryup” “33: Fullauto”

适用于 DNA 测序用 Plasmid DNA 的制备。处理较多菌体 (7~9O.D.) 时适合使用针对再次悬浊液的 “32: Dryup”, 处理较少菌时 (5~6O.D.) 时适合使用针对集菌后的菌体的 “33: Fullauto”。

• 操作程序 “34: Lowcost”

使用通过以下的操作设置处理过的样品。由于仅使用专用试管 1 个/样品 (其他操作程序时 3~4 个), 故能够以较低成本回收 Plasmid DNA, 并能够在 6min / 样品下实现限制酶处理, 以及转化用的 Plasmid DNA 的制备。

集菌后的菌体

- | ←150 μl 再次悬浮液
- | 用漩涡混合器搅拌 60sec
- | ←150 μl 溶解液（溶解液 I，II 按 4: 1 (v: v) 的比例混合后的溶液）
- | 反复颠倒试管 5 次以实现搅拌
- | 放置于冰上 5min
- | ←120 μl 中和液
- | 反复颠倒试管 5 次以实现搅拌
- | 放置于冰上 5min
- | 12,000rpm, 10min
- 设定MFX-2000

(2) 加温 block, 回收 block 的温度设定*1

	加温 block	冷却 block
温度设定	78℃	10℃

· 简易冷却时，冷却 block 应事先在冷藏库或者冷冻库内冷却。

(3) 附带专用过滤器的 tip 头设置

- 请使用附带专用过滤器的 tip 头（Code No: MFX-402）
- tip 已通过 γ 射线灭菌。戴上手套将需要量专用 tip 安装在 tip 架中。
- 关于 tip 的安装位置请阅读 MFX-2000 的使用说明书。

*1 设定方法请阅读MFX-2000 的使用说明书。

- 将需要量专用 tip 安装在 tip 架中。

		tip 数						tip 数			
操作程序号		31	32	33	34	操作程序号		31	32	33	34
样品数	1	10	11	11	5	样品数	13	61	74	74	26
	2	13	15	15	6		14	64	78	78	27
	3	16	19	19	7		15	67	82	82	28
	4	19	23	23	8		16	70	86	86	29
	5	27	32	32	12		17	78	95	95	33
	6	30	36	36	13		18	81	99	99	34
	7	33	40	40	14		19	84	103	103	35
	8	36	44	44	15		20	87	107	107	36
	9	44	53	53	19		21	95	116	116	40
	10	47	57	57	20		22	98	120	120	41
	11	50	61	61	21		23	101	124	124	42
	12	53	65	65	22		24	104	128	128	43

(4) 专用试管的设置

• 请将专用试管设置在抽提架中。摆放位置根据操作程序的不同而有所差异，请按照下表放置试管。

操作程序号	摆放场所
31~33	A. B. C. D. E. F
34	A. B. C. D

- 请对加温 block（只限于操作程序 32，33），回收 block 设置所需样品数。
- 对抽提架的 A~F 以及加温 block，请勿使用专用试管以外的其他试管。否则有可能会产生故障。
- 对于回收block，请使用Assist公司的No.72.730 试管。^{*1}

^{*1} 对于回收block，除了MFX-2000 专用试管外，带螺旋式盖的 1.5ml试管 Assist试管 No.72.692 等也能使用。由于回收液中会有不同程度的磁珠残留，回收液超过 50% 的场合下，请对这些试管进行 12,000rpm × 2min的离心操作（如果回收液在反应液中的比例小于 50% 则不会存在问题。）

(5) 试剂的设置

- 本试剂盒内不含有灭菌水和乙醇溶液（99.5%以上的特级品），请自己准备。
- 请准备 50ml容量试管FALCON 2170，15ml容量试管FALCON 2196，2ml容量试管Assist试管No.72.694。^{*1}

-
- 根据样品数的不同所需的试剂量也会不同。请根据第九页的表，在指定试管内注入所需试剂的必要剂量。
 - 注入试剂时请以试管上的刻度为标准。
 - 视操作程序，有可能不需要安装某些试剂。
 - 将各试管放置在试剂架中。请将磁珠 I，II 再次摇匀，放置在试剂架处。磁珠设置好后，请立刻启动装置（10 分钟以内）。（否则将产生回收量参差不齐及操作故障。）
 - 抽提后剩下的试剂可以再次使用（可追加减去的量并设置在 MFX-2000 上）。如果不再接下去使用，请将盖子盖好保存。如果长时间处于盖子打开状态，液体的组成成分有可能会起变化。
 - 使用的剂量请不要超过第九页表中记载的规定剂量。这是造成试管塞污染以及液体溢出的原因。

*1 使用其他物品会造成仪器运作不稳定。

【样品数在 1~12 时的试剂使用剂量】

试剂名	试管容量	分装量 (ml)				设置位置
		操作程序号				
		31	32	33	34	
吸附液	50ml	25	25	25	25	1
灭菌水	50ml	25	25	25	25	2
乙醇溶液	50ml	25	25	25	25	6
磁珠 I	2ml	1.5	1.5	1.5	不要	7
磁珠 II	2ml	1.5	1.5	1.5	1.5	8
再次悬浊液	15ml	不要	不要	5	不要	9
溶解液	15ml	5	5	5	不要	10
中和液	15ml	5	5	5	不要	11
溶出液	15ml	5	5	5	5	12

【样品数在 13~24 时的试剂使用剂量】

试剂名	试管容量	分装量 (ml)				设置位置
		操作程序号				
		31	32	33	34	
吸附液	50ml	25	25	25	25	1
灭菌水	50ml	25	25	25	25	2
乙醇溶液	50ml	50	50	50	50	6
磁珠 I	2ml	1.5	1.5	1.5	不要	7
磁珠 II	2ml	1.5	1.5	1.5	1.5	8
再次悬浊液	15ml	不要	不要	5	不要	9
溶解液	15ml	5	5	5	不要	10
中和液	15ml	5	5	5	不要	11
溶出液	15ml	5	5	5	5	12

(6) 样品的前处理及其设置

根据操作程序需要对以下样品进行前期处理。

①使用程序 31,32 时

集菌后的菌体

|←150 μl 再次悬浊液

| 用漩涡混合器搅拌 60sec

置于样品孔

②使用程序 33 时

- 把集菌后的菌体原样放入样品孔。

③使用程序 34 时

集菌后的菌体

|←150 μl 再次悬浊液

| 用漩涡混合器搅拌 60sec

|←150 μl 溶解液（溶解液 I，II 按 4:1 (v:v) 比例混合后的溶液）

| 反复颠倒试管 5 次以搅拌

| 放置于冰上 5min

|←120 μl 中和液

| 反复颠倒试管 5 次以搅拌

| 放置于冰上 5min

| 12,000rpm, 10min

置于样品孔^{*1}

- 将样品放入样品孔时，请保持试管盖开启状态（1~24 号样品的样品孔上印有号码）。
- 样品试管使用通常的 1.5ml 试管时，请先用剪子如下图所示进行剪断后再使用。剪断的时候请务必注意安全。

^{*1} 菌体残渣留在试管壁上时，试管仍然可以继续使用。由于 rotor 有时会使得菌体残渣留在试管底部，所以请将上清液置于其他试管后再进行使用。

(7) 抽提开始

- 请确认样品，试剂试管（试剂量），试管种类，专用 tip 等是否已按说明书所示安装完毕。
- 抽提之前，请先将tip废弃盒清空。
- 确认各台架的安装位置（锁定），确认操作台是否已完全收纳到里面，并将前门关闭。
- 在液晶画面上输入操作程序的号码以及样品数。
- 确认显示有“请按下开始键”的画面内容后，按下“START”按键。
- 抽提操作开始时，液晶画面会显示“操作中”字样。
- 手伸进驱动部位会有危险，因此操作中请务必关好前门，不要开启。

(8) 样品回收

- 所有抽提操作结束后，会再次显示“请按下开始键”字样的画面。
- 抽提的 DNA 被回收 block 上的试管回收。确认装置完全停止运行后，从回收 block 块上取出试管，将其在低温（4~10℃）下保存，直至使用为止。
- 如果回收液中混入少量的磁珠，仍可以直接使用。
- 从加温block上取出试管时，请确认加温block的开关是否已关闭并且温度已下降至 40℃ 以下。如果在加温block尚热的时候去取试管，有可能发生烫伤。

(9) 通过手动法抽提 plasmid DNA 的方法

①操作程序 I（限制酶处理，转化等级）

集菌后的菌体

|←150 μl 再次悬浊液

| 用漩涡混合器搅拌 60sec

|←150 μl 溶解液（溶解液 I，II 按 4:1(v:v)比例混合后的溶液）

| 反复颠倒试管 5 次以搅拌

| 放置于冰上 5min

|←120 μl 中和液

| 反复颠倒试管 5 次以搅拌

| 放置于冰上 5min

- | 12,000rpm, 5min
- | 将上清液放入新的 1.5ml 试管中
- | ←500 μ l 吸附液
- | ←30 μ l 磁珠 II (反复颠倒搅拌, 使其均匀混合)
- | 搅拌 60sec ^{*1}
- | B/F 分离 ^{*2}
- | ←720 μ l 170% 乙醇溶液
- | 搅拌 30sec
- | B/F 分离
- | ←50 μ l 溶出液
- | 搅拌 60sec
- | 12,000rpm, 5min
- | B/F 分离
- 上清液

重复两次

②操作程序 II (DNA 测序等级)

集菌后的菌体

- | ←150 μ l 再次悬浊液
- | 用漩涡混合器搅拌 60sec
- | ←150 μ l 溶解液 (溶解液 I, II 按 4:1(v:v)比例混合后的溶液)
- | 反复颠倒试管 5 次以搅拌
- | 放置于冰上 5min
- | ←120 μ l 中和液
- | 反复颠倒试管 5 次以搅拌

^{*1} 将搅拌强度设为最大, 在室温下用漩涡混合器或试管混合器进行搅拌。

^{*2} 将试管置于磁性台架上, 磁珠靠近磁石, 多次颠倒混合, 使得盖子上的磁珠完全贴近磁石。然后, 轻轻震动磁性台架, 使得粘在盖子上的溶液摔落下来。用微量移液器吸弃上清部分。

- | 放置于冰上 5min
 - | 12,000rpm, 5min
 - | 将上清液放入新的 1.5ml 试管中
 - | ←500 μ l 吸附液
 - | ←30 μ l 磁珠 II（反复颠倒搅拌，使其均匀混合）
 - | 搅拌 60sec
 - | B/F 分离
 - | ←720 μ l 170%乙醇溶液
 - | 搅拌 30sec
 - | B/F 分离
 - | ←500 μ l 乙醇溶液
 - | 搅拌 30sec
 - | B/F 分离
 - | 78°C, 15min（使磁珠干燥）
 - | ←50 μ l 溶出液
 - | 搅拌 60sec
 - | 12,000rpm, 5min
 - | B/F 分离
 - | 上清液
- } 重复两次

[5] 一般样品的分析

(1) A260, A280, A320 的测定

- 请将回收液瞬时高速离心后进行测定。
- 请用 TE 缓冲液的 10~30 倍稀释后进行测定。

(2) 电泳

- 5x Loading Dye: 样品: 电泳缓冲液 = 按 2: 3: 5~2: 7: 1 比例稀释。

(3) DNA 测序

- 按照操作程序 32, 33 抽提出的 DNA 以及按照手动操作程序 II 抽提出的 DNA, 请使用 5~10 μ l 用于反应。
- 按照操作程序 31, 34 抽提出的 DNA 以及按照手动操作程序 I 抽提出的 DNA, 其中混有 10%浓度的乙醇溶液, 会阻碍测序反应, 请先去除乙醇。
- 将样品 15 μ l 注入到 0.5ml 试管内。
- 以 78°C 的温度加温直至液体蒸发完 (约 15min), 然后用此试管混合反应液。

[6] 疑难解答

1. 使用 MFX-2000 的场合

(1) plasmid DNA 的回收量少，纯度差

原因	对策
试剂量不足	在 C, D, E 孔中 B/F 分离后会分别剩下 800 μ l, 720 μ l 及 720 μ l 左右的试剂。如果此溶液量过少的话，则原因是使用的试剂量不足。请加液到规定剂量。如果回收液过少或者没有，有可能是没有安装溶出液或溶出液少的缘故。
样品量过多	A, B 孔的抽提试管中剩有 50 μ l 以上的液体时，可能是因为菌体量过多，无法用专用 tip 吸走。请使用 9 O.D. 以下的菌体。

2. 使用手动操作的场合

(1) plasmid DNA 的回收量少

原因	对策
磁珠 II 的使用量过少	请使用磁珠 II 的规定剂量。
吸附液的使用量过少	请使用吸附液的规定剂量。
用 70% 以下浓度的乙醇溶液清洗磁珠，或者清洗时间过长	请用 70% 乙醇溶液洗净。清洗请不要超过 1min。
溶出液过少	请使用 50 μ l 以上的溶出液。
Plasmid DNA 的拷贝数过少	使用手动法的情况下，请增加抽提规模。菌体量，试剂的使用量可以增加至 2 倍。不过溶出液也会因此而增加，故回收浓度不会上升。

(2) Plasmid DNA 纯度差

原因	对策
菌体的溶解，残渣的凝聚工序不能正常进行	请使用规定的溶解工序时间及溶解液剂量。此工序下的纯度如果偏低，吸附·洗净时的磁珠就会难以分散，回收液的纯度也会因此变差。
用 70%以上浓度的乙醇溶液来清洗磁珠，或者洗净时间过短。	请用 70%乙醇溶液清洗，直至磁珠完全分散（1min）。

[制造 · 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室

邮编：200122

交货期限 · 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 · 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

代理商资料：