

MagPure Plasmid EF 96 Kit

磁珠法低内毒素质粒试剂盒

本产品采用磁珠法纯化技术，适合于从 1~5ml 细菌培养液中提取高浓度和高产量的低内毒素质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 20ug，内毒素含量 <0.1EU/μg，浓度高达 0.5μg/μl，可直接用于细胞转染和动物注射等。60 分钟内可以完成整个抽提工作，操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也无需用到耗时的醇类沉淀。

产品组份

Cat.No.	P1814-01	P1814-02	P1814-03
纯化次数	50 次	200 次	500 次
RNase A *	5 mg	10 mg	20 mg
Buffer P1	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer P2	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer LEN3	7 ml	30 ml	80 ml
Buffer LN4	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer EVB	40 ml	160 ml	2 x 200 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	60 ml
MagPure Particles	1.8 ml	7 ml	18 ml

版本号：2024-01

保存条件

本产品可在室温下保存 18 个月。RNase A 干粉室温运输和保存，长期保存(>3 个月)放置于 -20~8℃。低温下，Buffer P2/LN4 会有沉淀形成，55℃ 水浴使沉淀完全溶解。

准备条件

- 加入 0.2~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 充分溶解，然后把 RNase A 全部转移至 Buffer P1 中，于 2-8℃ 保存，有效期为 6 个月。

方案 1. 单管式操作

1. **13,000 × g 离心 1 分钟，收集 1~5ml 菌体，倒弃培养基，在吸水纸上拍打吸尽残液。**
培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取单菌落接种于 1~5ml 含相应抗生素的 LB 培养液中，37℃ 摇床 (250-300rpm) 培养 12-14 小时。培养管或培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。2 × YT 或 TB 培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过 2.5ml。2 × YT 或 TB 培养液中菌体生长速度过快，不利于质粒充分复制，应尽量避免使用。处理低拷贝载体，菌液用量可以达到 15ml，按 1.5 倍扩大 Buffer P1/P2/INP3 的体积。
2. **加入 250µl Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬菌体。**
使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。
3. **往重悬液中加入 250µl Buffer P2，颠倒混匀 8~10 次或直至菌体完全裂解。**
涡旋或振荡会造成基因组污染。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。菌体较多时室温放置 2~3 分钟，其间再颠倒几次以充分裂解。当菌液用量达 5ml 时，裂解液会极为粘稠，属于高密度碱裂解类型，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并轻微振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液，总裂解时间不要超过 5 分钟。
4. **加入 130µl Buffer LEN3，立即颠倒 10~15 次直至形成蛋花状悬浊液。13,000 × g 离心 10 分钟。**
加入 Buffer LEN3 后应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。
5. **转移 500µl 上清液至新的 1.5ml 离心管中。**
6. **加入 250µl Buffer LN4、150µl 异丙醇和 30µl MagPure Particles 至样品中，颠倒混匀 15-20 次，静置 2~3 分钟，其间颠倒混匀数次。转移至磁力架上吸附 1 分钟，吸弃或倒弃所有的溶液。**
Buffer LN4，异丙醇和磁珠 MP 可以按比例进行预混。

7. 加入700µl Buffer EWB, 涡旋混匀15~30秒, 转移至磁力架上吸附1分钟。吸弃溶液。
8. 短暂离心, 吸弃所有溶液。加入700µl 80%乙醇, 涡旋混匀15秒, 转移至磁力架上吸附1分钟。吸弃溶液。
9. 加入700µl 80%乙醇, 涡旋混匀15秒, 转移至磁力架上吸附1分钟。吸弃溶液。
10. 短暂离心, 吸弃所有溶液, 空气干燥10分钟。
11. 加入50~100µl Elution Buffer, 混匀10秒, 室温静置5分钟, 其间涡旋混匀数次。转移至磁力架上吸附2分钟, 把DNA转移至新的1.5ml离心管中。

方案 2. 96 孔板操作

1. 在96孔2.2ml深孔板(自配)中, 加入1.0~1.3ml培养液, 接种单克隆菌斑, 贴上透气封口膜, 37°C, 220~280rpm摇床培养20~24小时扩增质粒。
2. 2,500~4,000 × g离心10分钟收集菌体, 撕弃封口膜, 倒弃培养液, 把96孔板反扣于吸水纸上, 轻轻拍打几下以吸尽残液。
3. 每孔中加入250µl Buffer P1/RNase A混和液, 最高速度涡旋或吸打重悬细菌。
使用前, 须确保RNase A已加到Buffer P1中。彻底重悬细菌对获得高产量是相当重要的, 重悬后应看不到细胞团块。若有96孔板涡旋仪如IKA MS3等, 最高速度涡旋3-5分钟。
4. 每孔中加入250µl Buffer P2, 贴上封口膜, 温和地上下颠倒混匀10-15次, 短暂离心收集孔口的液滴, 室温放置3分钟。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等, 300~600rpm低速振荡3~5分钟。
5. 撕去封口膜, 每孔加入130µl Buffer LEN3, 贴上封口膜, 立即温和地上下颠倒混匀10-15次, 3,000~4,000 × g 离心20分钟。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等, 300~600rpm低速振荡5分钟。
6. 用8通道移液枪转移500µl上清液至新的2.2ml的96孔板中。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等, 300~600rpm低速振荡5分钟。
7. 加入250µl Buffer LN4、150µl异丙醇和30µl MagPure Particles至样品中, 振荡混匀3-5

分钟。

调整振荡速度让样品达到最佳的混匀效果，但不能让溶液溢出孔口，可用同体积的水进行测试。Buffer LN4，异丙醇和磁珠MP可以按比例进行预混。

8. **转移至96孔磁力架上吸附2分钟。将磁力架和96孔板扣在一起，反转180度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸1分钟吸尽残液。**

在反转倒废液时，让磁力架和96孔板紧扣一起不要松动，以防止磁珠的丢失，废液倒完后，反扣于吸水纸上吸尽孔口的残液，不要让溶液回流到孔中。

9. **加入700 μ l Buffer EWB至孔中。1,000~1,200rpm振荡混匀1分钟打散磁珠。转移至磁力架上吸附2分钟。将磁力架和96孔板扣在一起，反转180度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸1分钟吸尽残液。**

10. **加入700 μ l 80%乙醇。1,000~1,200rpm振荡混匀1分钟打散磁珠。转移至磁力架上吸附2分钟。将磁力架和96孔板扣在一起，反转180度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸1分钟吸尽残液。**

11. **加入700 μ l 80%乙醇。1,000~1,200rpm振荡混匀1分钟打散磁珠。转移至磁力架上吸附2分钟。将磁力架和96孔板扣在一起，反转180度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸1分钟吸尽残液。**

12. **让磁力架和96孔板一起反扣于吸水纸5分钟彻底吸弃残液。把96孔板正放，37~45°C进一步干燥15分钟。**

13. **加入100 μ l Elution Buffer，1,200rpm振荡混匀3~5分钟。转移至磁力架上吸附3分钟，把DNA转移至新的96孔板中。**