

MagPure Plasmid EF Midi Kit

低内毒素质粒中提试剂盒

本产品适合于从 50~75ml 细菌培养液中提取高浓度的低内毒素质粒 DNA。试剂盒采用独特的溶液体系和改良硅胶膜抽提体系，质粒产量可高达 0.2mg，内毒素含量<1EU/ μ g，浓度高达 1 μ g/ μ l。得到的质粒可直接用于细胞转染和动物注射等。

产品组份

产品编号	P1816-02	P1816-03
包装次数	10 次	50 次
RNase A	10 mg	20 mg
Buffer P1	30 ml	140 ml
Buffer P2 Blue	30 ml	140 ml
Buffer NS3	30 ml	140 ml
Buffer ERS4	20 ml	90 ml
Buffer LN4	60 ml	270 ml
Buffer EW8	30 ml	140 ml
Buffer PW2*	12 ml	50 ml
Buffer TE	10 ml	30 ml
Clear Midi Syringe C (20ml)	10 个	50 个
MagPure Particles N	6 ml	27 ml

版本号：202510

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°C。低温下，Buffer E2 会有沉淀形成，55°C水浴使沉淀完全溶解后使用。

准备事项

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
- 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°C 保存，有效期为 6 个月。

第一部分：上清液的制备

1. **初级培养：**将含目的质粒的大肠杆菌菌种接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5-10 ml 培养管中，37°C 摆床培养 8 小时进行小量扩增菌液。

培养方法：在无菌条件下，用灭菌牙签挑取一单菌落，转移 1ml 含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C 摆床(200-300rpm)培养 6-8 小时。甘油保存菌种在保存过程可能会丢失载体，先划平板进行活化，用灭菌牙签挑取一单菌落进行初步培养。

2. **扩大培养：**在 250mL 培养瓶中加入 50~75mL 含抗生素 LB 培养液，移液器 50~75ul 初级菌液至培养瓶中，37°C 摆床培养 14~16 小时。

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。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。

3. **菌体收集：**转移 50~75ml 培养液到合适的离心管中，8,000rpm 离心 5 分钟收集细菌。

水平转子离心机：，3,000-5,000 × g 离心 15 分钟收集细菌。

4. **菌体重悬：**倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液，加入 2.5 ml Buffer P1/RNase A 混和液至菌体中，高速涡旋重悬细菌。

充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显菌块。

5. **菌体裂解：**加入 2.5 ml Buffer P2 Blue，温和地上下颠倒并转动离心管 15~20 次，室温静置 4 分钟，其间颠每隔 1 分钟温和地颠倒混匀 3-4 次。

颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的溶液而且透亮。涡旋会造成基因组污染。混匀后溶液应变得粘稠而透亮。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，并轻稍振荡让菌体充分裂解，形成均一无团块的裂解液。

6. **菌体中和:** 加入 2.5 ml Buffer NS3 至裂解液，稍快速上下颠倒混匀 15~20 次或直至形成蛋白状悬浊液，按快速转染级方案或无内毒素方案进行操作。

加入 Buffer NS3 后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀，本流程属于高密度碱裂解类型，中和时会形成大块且紧密的沉淀团，混匀时需要更多次数的颠倒和翻转动作，并轻稍振荡让大块沉块团分散成较少的团块，让 Buffer NS3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

转染级质粒 DNA 方案:

7. **过滤除杂:** 缓慢取出活塞，把第 6 步的混合液全部倒入针筒中，水口对准离心管或合适大小的瓶子，插入活塞并缓慢推动使裂解液过滤到容器中，然后按第二部分进行操作。

无内毒素质粒 DNA 方案:

7. **离心除杂:** 8,000rpm 离心 5 分钟沉淀杂质。

8. **沉淀内毒素:** 把上清液倒至新的离心管中，加入 1.4 ml Buffer ERS4，颠倒混匀 10-15 次，室温放置 5 分钟，-20°C 度放置 10 分钟让内毒素充分析出。

9. **过滤除杂:** 缓慢取出活塞，把第 8 步混合液全部倒入针筒中，水口对准离心管或合适大小的瓶子，插入活塞并缓慢推动使裂解液过滤到容器中，然后按第二部分进行操作。

第二部分：质粒制备

1. 测量滤液体积，加入 1/2 倍体积 Buffer LN4 和 500ul MagPure Particles N，颠倒混匀 10~15 次，室温放置 3 分钟，其间颠倒混匀数次。8,000 rpm 离心 2 分钟收集磁珠或磁力架静置 3 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
2. 加入 2.5ml Buffer EW2，涡旋 10 秒重悬磁珠，颠倒混匀数次，8,000 rpm 离心 2 分钟收集磁珠或磁力架静置 3 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
3. 加入 2.5ml Buffer PW2(已加乙醇稀释)，涡旋 10 秒重悬磁珠，颠倒混匀数次，8,000 rpm 离心 2 分钟收集磁珠或磁力架静置 3 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
4. 加入 2.5ml Buffer PW2(已加乙醇稀释)，涡旋 10 秒重悬磁珠，颠倒混匀数次，8,000 rpm 离心 2 分钟收集磁珠或磁力架静置 3 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
5. 短暂离心收集残液，吸尽所有的残液，37 度干燥 10~15 分钟。
6. 加入 250ul Buffer TE 至磁珠中，涡旋重悬磁珠，室温放置 10 分钟，其间混匀数次。10,000 × g 离心 3 分钟收集磁珠或磁力架静置 3 分钟收集磁珠，转移上清液至新的离心管中。