

MagPure Plasmid DNA Midi EF Kit

磁珠法无内质粒 DNA 中提预装试剂盒

本产品采用采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，适合于从 50~75ml 细菌培养液中提取中低拷贝的去内毒素质粒 DNA，最高产量可达 250μg（二次结合可达 500μg），纯化的质粒可直接用于细胞转染、自动测序、酶切、PCR 和标记等。60 分钟可以完成数个样品的抽提工作，整个操作过程不需接触酚氯仿等有机物抽提，也不需用到耗时的醇类沉淀。

产 品 组 份

货 号	P1816-M8-8	P1816-M8-48	P1816-M8-96
RNase A	5 mg	10 mg	30 mg
Buffer P1	22 ml	125 ml	250 ml
Buffer P2 Blue	22 ml	125 ml	250 ml
Buffer NS3	22 ml	125 ml	250 ml
Buffer ERS4	15 ml	80 ml	160 ml
中量过滤器 C (10ml)	8 个	48 个	96 个
磁棒套	1 条	6 条	12 条
预装试剂	1 板	6 板	12 板
48 孔 方孔板	样品孔(1): 0.8ml Buffer LN4 样品孔(2): 0.8ml Buffer LN4 清洗孔(3): 0.8ml Buffer LN4 清洗孔(4): 0.8ml Buffer LN4 清洗孔(5): 2.6ml Buffer EWB 清洗孔(6): 2.6ml Buffer SW2/0.4ml MPN		

备注：取 0.4ml 磁珠 MPN，吸弃水份，加入 2.5ml Buffer SW2 重悬后分装。

保 存 条 件 本产品室温运输和保存，有效期 18 个月。

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。

实验步骤：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 5-10ml 培养管中，37℃ 摇床培养 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℃ 摇床(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 50ul 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 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 x 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 50ml 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 x 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，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，并轻轻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 15~30 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，并稍稍振荡让大块沉淀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。

快速转染级方案：

7. **离心除杂（可选）：**8,000rpm 离心 5 分钟沉淀杂质。
8. **过滤除杂：**缓慢取出活塞，把第 6 步或第 7 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。

无内毒素方案：

7. **离心除杂：**8,000rpm 离心 10 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℃ 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。

第二部分: 8 通道核酸提取仪操作

1. 预分装试剂：先振荡 48 孔板让磁珠充分悬浮，轻轻拍打让液体流回孔中，正放 10~15 分钟后气泡完全消化后，去除封口袋和封口膜。瓶装试剂：按预分装的表格，把各种试剂添加到对应的孔中。
2. 在洗脱条中，每孔加入 250~300ul Elution Buffer，放到仪器中。在第 1/2/3/4 排孔，每孔分别加入 1.6~2.0ml 上清液（按第一部分准备，平均分配，最多不要超过 2.0ml）。
3. 编写程序，并启动对应程序，约 60 分钟结束，取出 48 孔板和磁力外套。
4. 把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中（约有 50ul 洗脱液损失）。若转移 DNA 溶液中含有磁珠污染，于 13,000 x g 离心 3 分钟，转移上清液至新的离心管中，把产物保存于-20~8℃。
- 受磁珠和磁套的粘附损失，300ul 洗脱液实得 250ul。若质粒产量超过 0.25mg，移出洗脱液，再加入 0.25ml Elution Buffer 至第 7 排孔中，重复运作程序进行第二次结合，最后合并两次洗脱液。

序号	步骤名称	孔位	容积	混合时间		等待		磁吸时间			吸磁	加热	
				时间	速度	时间	位置	升降	液面	底部		板位	温度
1	吸磁	6	2.5	30	9/8	0	0	120	0	0	自动	/	/
2	结合1	1	2.7	150	9/8	0	0	120	30	0	自动	/	/
3	结合2	2	2.7	150	9/8	0	0	120	30	0	自动	/	/
4	结合3	3	2.7	150	9/8	0	0	120	30	0	自动	/	/
5	结合4	4	2.7	150	9/8	0	0	120	30	0	自动	/	/
6	清洗1	5	2.5	150	9/8	0	0	120	30	0	自动	/	/
7	清洗2	6	2.5	150	9/8	0	0	120	30	0	自动	/	/
8	干燥	7	0.3	0	0	6 min		0	0	0	自动	/	/
9	洗脱	7	0.3	300	8	0	0	120	0	0	自动	7	55
10	弃磁	6	2.2	60	8	0	0	0	0	0	自动	/	/