

MagPure Plasmid EF HC Kit

磁珠法无内质粒中提试剂盒

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 0.5mg，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	P1815-02	P1815-03
包装次数	10 次	50 次
RNase A	10 mg	20 mg
Buffer E1	30 ml	150 ml
Buffer E2	30 ml	150 ml
Buffer E3	30 ml	150 ml
Buffer E4 Plus	30 ml	150 ml
Buffer E5	30 ml	150 ml
Buffer EWB	30 ml	150 ml
Buffer PV2*	10 ml	50 ml
Buffer TE	15 ml	30 ml
Buffer ER2	10 ml	50 ml
Buffer BCP	10 ml	50 ml
Clear Mini Syringe (10ml)	10 个	50 个
MagPure Particles	2.5 ml	121 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℃。低温下，Buffer E2/E4 会有沉淀形成，55℃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 E1 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 E1 中，于 2-8℃保存，有效期为 6 个月。
- 低温下，Buffer E4 Plus 有沉淀析出，于 55℃水浴溶解。

第一部分：上清液的制备

1. 将单克隆菌斑接种于含 1ml LB/抗生素培养基的 5~10ml 培养管中，37℃摇床培养 6~8 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. 在 200ml 培养瓶加入 50~75 ml LB/抗生素培养液，接种 0.001 倍初级菌液至培养瓶中，37℃摇床培养 12-16 小时。

培养瓶容量最好超过培养液体积的 4-5 倍。培养过夜后可通过菌液密度或 OD600 来判断，培养良好的菌液(LB 培养液)，OD600 应该在 2.0-3.0。本产品不要用 TB 或 2 × YT 等丰富培养基进行培养细菌。使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。

3. 3,000~5,000rpm 离心 10 分钟收集 50~75 ml 菌液。倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。

4. 加入 2.6ml Buffer E1/RNase A 混和液，高速涡旋或吸打充分重悬细菌。

充分重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到明显的菌块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。

5. 加入 2.6ml Buffer E2 至重悬液，温和地上下颠倒并转动离心管 6~8 次，室温静置 2 分钟，其间颠倒混匀数次直至形成透光无团块的裂解液。

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。当菌液用量达 50ml 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，并稍稍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。

6. 加入 2.6 ml Buffer E3 至裂解液，立即稍快速上下颠倒 10~15 次或直至形成蛋花状的悬浊液，3,000~5,000rpm 离心 5 分钟。

加入 Buffer E3 后应立即稍快速上下颠倒混匀，以避免产生局部沉淀。当菌液用量达 50ml 时，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块团分散成较少的团块，让 Buffer E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. 取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第 6 步的上清液倒入过滤器中，把活塞插入过滤器，推动活塞使裂解液过滤到合适的离心管或瓶子中。

8. 按第二部分提取转染级方案或按第 9~10 步提取无内毒素质粒 DNA。

9. 加入 0.1 倍体积的 Buffer ER2 至滤液中，颠倒 10-15 次，冰上或 2-8 度放置 10 分钟。

10. 加入 0.1 倍体积的 Buffer BCP，快速振荡 15 秒。室温下，8,000rpm 离心 10 分钟得上清液，按第二部分提取无内毒素质粒 DNA。

第二部分：质粒制备

1. 测量滤液或上清液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4 Plus (~2.4ml)和 200ul MagPure Particles，颠倒混匀 6~8 次，室温放置 5 分钟，其间颠倒混匀数次。4,000 x g 离心 1 分钟收集磁珠或磁力架静置 1 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液
2. 加入 2.5ml Buffer E5，涡旋 10 秒重悬磁珠，颠倒混匀数次，4,000 x g 离心 1 分钟收集磁珠或磁力架静置 1 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
3. 加入 2.5ml Buffer EWB 至样品中，涡旋 10 秒重悬磁珠，颠倒混匀数次，4,000 x g 离心 1 分钟收集磁珠或磁力架静置 1 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
4. 加入 2.4ml Buffer PW2(已加乙醇稀释)至磁珠中，涡旋 10 秒重悬磁珠，颠倒混匀数次，4,000 x g 离心 1 分钟收集磁珠或磁力架静置 1 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
5. 加入 2.4ml Buffer PW2(已加乙醇稀释)至磁珠中，涡旋 10 秒重悬磁珠，颠倒混匀数次，4,000 x g 离心 1 分钟收集磁珠或磁力架静置 1 分钟收集磁珠，小心倒弃或吸弃上清液。
6. 短暂离心收集残液，吸尽所有的残液，55 度干燥 10 分钟。
7. 加入 200~300ul Buffer TE，涡旋重悬磁珠，室温放置 10 分钟，其间混匀数次。转 4,000 x g 离心 1 分钟收集磁珠或磁力架静置 1 分钟收集磁珠，转移上清液至新的离心管中。

常见问题

1. DNA 产量低

- **质粒拷贝数:** 载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2~3 倍的产量波动, (每毫升培养过夜的菌液, 高拷贝数的质粒载体产量为 4~16 μ g)。长片段质粒(>8KB)和表达型载体常以中低拷贝数为主, 每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μ g。
- **菌种问题:** 菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 养菌前最好先划线活化, 以稳定产量。
- **细胞未充分裂解:** 细菌须在 BufferE1/RNaseA 中充分重悬, 成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **低温离心:** 加入 BufferE4 Plus 后, 不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** BufferE4 不能低温放置, BufferE2/E4 Plus 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer E4 Plus 体积:** Buffer E4 Plus 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer E4 Plus 会导致产量的波动。

2. RNA 污染

- **RNase 的用量和保质期:** RNaseA 保存于 2~8 度, 长期保存时放置于-20 度。
- **菌液培养时间:** 本产品对 RNA 污染较为敏感, 建议细菌培养时间不超过 16 小时, 以降低菌液中 RNA 的丰度。
- **去除 RNA 污染:** 处理某些菌液时, 得到的质粒可能存在 RNA 污染, 通过醇类重沉淀可以去除 RNA。