

## MagPure Plasmid DNA EF Midi Kit

### 磁珠法无内毒素质粒 DNA 中量预装试剂盒

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 50~80ml 细菌培养液中提取高达 500 $\mu$ g 的质粒 DNA。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	P1815-M8-8	P1815-M8-48	P1815-M8-96
RNase A	6 mg	40 mg	80 mg
Buffer E1	22 ml	140 ml	270 ml
Buffer E2	22 ml	140 ml	270 ml
Buffer E3	22 ml	140 ml	270 ml
Elution Buffer	5 ml	30 ml	60 ml
Buffer ER2	8 ml	45 ml	90 ml
Buffer BCP	8 ml	45 ml	90 ml
Clear Mini Syringe	8 个	48 个	96 个
洗脱条	1 条	6 条	12 条
磁棒套	1 条	6 条	12 条
预装试剂	1 板	6 板	12 板
48 方孔板 预装试剂内容	样品孔(1): 0.64ml Buffer E4 Plus 和 60 $\mu$ l 磁珠 MP 样品孔(2): 0.64ml Buffer E4 Plus 和 60 $\mu$ l 磁珠 MP 样品孔(3): 0.64ml Buffer E4 Plus 和 60 $\mu$ l 磁珠 MP 清洗孔(4): 2.5ml Buffer ETR 清洗孔(5): 2.5ml Buffer EWB 清洗孔(6): 2.5ml Buffer GW2		

Buffer E4 Plus/磁珠 MP 配制：取 17ml 磁珠 MP 上磁力架，吸弃全部水份，然后 200ml Buffer E4 Plus，搅拌混匀，在搅拌条件下分装 0.68~0.72ml 混合液至 1/2/3 孔中。

**保存条件** 本产品室温运输，除 Buffer BCP 于 2~8℃ 保存，其他组分室温保存，有效期 18 个月。

**准备条件** 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。

## 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 500ml 培养瓶中加入 50~80 ml 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 50~80 ml 培养液到合适的离心管中，8,000rpm 离心 3 分钟收集细菌。

建议用 50ml 离心管收集菌液，超过 50ml 菌液，可以重复两次离心步骤收集细菌。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 2.6ml Buffer E1/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 2.6 ml Buffer E2，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 6-8 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 2.6 ml Buffer E3 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。8,000rpm 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，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 E3 完全渗透到沉淀内部进行充分中和。

7. **缓慢取出过滤器活塞，把第 6 步的上清液或混合液全部倒入过滤器中。**把过滤器出水口对准离心管或合适大小的瓶子（自备）。插入活塞并推动使裂解液过滤到合适容器中。

若第 6 步不离心，把混合液全部倒入针筒中，静置 5-10 分钟让沉淀物漂浮到溶液表面，然后再插入活塞并推动，让溶液滤出。

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: 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 400ul Elution Buffer, 放到仪器中。
3. 在第 1/2/3 排孔, 每孔分别加入 2.1ml 上清液 (按第一部分准备)。
4. 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。
5. 把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中 (约有 50ul 洗脱液损失)。
6. 若转移 DNA 溶液中含有磁珠污染, 于 13,000 xg 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℃。

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	结合1	1	2.6	120	9/8	0	0	0	0	0	自动	/	/
2	结合2	2	2.6	120	9/8	0	0	0	0	0	自动	/	/
3	结合3	3	2.6	120	9/8	0	0	0	0	0	自动	/	/
1	结合1	1	2.6	150	9/8	0	0	90	30	0	自动	/	/
2	结合2	2	2.6	120	9/8	0	0	90	30	0	自动	/	/
3	结合3	3	2.6	120	9/8	0	0	90	30	0	自动	/	/
4	清洗1	4	2.2	120	10/10	0	0	60	30	0	自动	/	/
5	清洗2	5	2.2	70	10/10	0	0	0.1	0	30	自动	/	/
6	清洗2	5	2.2	70	10/10	0	0	60	30	0	自动	/	/
7	清洗3	6	2.2	70	10/10	0	0	0.1	0	30	自动	/	/
8	清洗3	6	2.2	70	10/10	0	0	60	30	0	自动	/	/
9	干燥	7	0.3	0	0	8 min		0	0	0	自动	/	/
10	洗脱	7	0.3	400	7	0	0	90s	0	0	自动	7	55
11	弃磁	6	2.2	60	8	0	0	0	0	0	自动	/	/