

MagPure Plasmid EF 96 Kit B

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.	P1814-01B	P1814-02B	P1814-03B
Package	50 次	200 次	500 次
RNase A *	5 mg	10 mg	30 mg
Buffer E1	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer E2	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer E3	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer E4	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer ETR	30 ml	120 ml	270 ml
Buffer EVVB	30 ml	120 ml	270 ml
Buffer PW2*	20 ml	50 ml	100 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	100 ml
MagPure Particles	3 ml	10 ml	20 ml

版本号：202401

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。

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。
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2 瓶子于室温保存。

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 E1/E2/E3 的体积。
- 2 **加入 230μl Buffer E1/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 E1。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 230μl Buffer E2，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。
- 4 **加入 230μl Buffer E3，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 E3 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 600μl 上清液至新的 1.5ml 离心管中。**
- 6 **加入 200μl Buffer E4 和 20μl MagPure Particles 至样品中，颠倒混匀 6-8 次，静置 2~3 分钟，其间颠倒混匀数次。转移至磁力架上吸附 2 分钟，吸弃或倒弃所有溶液。**
- 7 **加入 500μl Buffer ETR，涡旋混匀 15~30 秒，转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。**
- 8 **加入 500μl Buffer EVVB，涡旋混匀 15~30 秒，转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。**
- 9 **短暂离心，吸弃所有溶液。加入 750μl Buffer PW2，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50~100 μ l 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. **96孔板培养：**在2.2ml深孔板，每孔加入1.0~1.3ml YT培养液，接种单克隆菌斑，贴上透气封口膜，37℃，220~280rpm摇床培养16小时扩增质粒。

24孔板培养：在24孔深孔板，每孔加入5.0 ml LB培养液，接种单克隆菌斑，贴上透气封口膜，37℃，220~280rpm摇床培养16小时扩增质粒。

2. 2,500 $\times$ g离心10分钟收集细菌。倒去培养基，并倒置于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。此时样品可以密封并在-20~-80℃下冷冻以便后续处理。

3. **每孔中加入240 μ l Buffer E1/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 E1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。若用移液工作站或板式涡旋仪(如IKA MS3)等，最高速度涡旋3-5分钟或直至菌体充分重悬。24孔培养时，重悬后把4个24孔板的重悬液合并至96孔板。

采用移液工作站进行全自动提取时，可以采用磁珠法除杂质，加入30 μ l MagPure Particles重悬液中，Buffer E1/RNase和MagPure Particle可以预先配制成混合液，按240 μ l Buffer E1加30 μ l MagPure Particles的比例进行预混，该混和液可2-8度放置6个月。采用磁珠法除杂质时，LB培养液建议不要超过3ml。

移液工作站或96孔板涡旋仪 (IKA MS3): 最高速度振荡5~10分钟使细菌充分重悬。

4. **每孔中加入240 μ l Buffer E2，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2分钟。**

移液工作站或96孔板涡旋仪 (IKA MS3): 400~700rpm低速振荡3~5分钟。

5. **撕去封口膜，每孔加入240 μ l Buffer E3，贴上封口膜，立即上下颠倒混匀10-15次，1000-1200rpm振荡2分钟让大块沉淀分散。**

移液工作站或96孔板涡旋仪 (IKA MS3): 600~800rpm低速振荡3分钟，1000-1200rpm振荡2分钟使大块沉淀分散成小块沉淀或蛋白花沉淀块，以方便下一步的除杂操作。

6. **选择合适的方案去除中和后形成的杂质。**

离心除杂: 4,000~4,500 $\times$ g离心20分钟沉淀杂质，用移液器或移液工作站缓慢地从最高液面位置吸取上清液(~500 μ l)。通常20分钟离心足以沉淀絮状物，如果絮状物没有紧密地附着在孔

底则应增加离心时间

离心过滤除杂：把96过滤板B（另外订购，M06401）放置于96孔1.6~2.2ml板中，转移全部混合液至过滤板中，4,000 × g离心3分钟过滤去除杂质得到澄清的滤液。

负压抽滤除杂：把96过滤板（另外订购，M06401）放置于负压抽滤盒中，底部放入96孔1.6-2.2ml收集板，转移全部混合液至过滤板中，打开负压装置进行抽滤得到澄清的滤液。

磁珠法除杂：进行磁珠法除杂时，第3步必须加入30μl MagPure Particles，中和后磁珠和絮状沉淀结合在一起，形成有磁性的沉淀物。把样品放置在96孔磁力架上静置3-5分钟将磁珠和杂质吸附在侧壁或底部，然后用缓慢吸液方式转移出适量的上清液（~500μl）。

7. **转移适量的体积的上清液至新的96孔板中，加入1/3倍Buffer E4和20μl MagPure Particles至样品中，振荡混匀3-5分钟。**

上清液体积取决于除杂方式，离心或磁珠除杂时，建议把上清液控制在500μl，以避免吸取杂质，过滤除杂可得到更多滤液。测量滤液体积，调整Buffer E4用量，控制在28~33%加入量。

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。

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500μl Buffer ETR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1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500μl 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。**

11. **加入750μl Buffer PW2，1,000~1,200rpm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，37~55℃进一步干燥10分钟。**

13. **加入100μl Elution Buffer，1,000~1,200rpm振荡混匀5~10分钟溶解质粒DNA。转移至磁力架上吸附3分钟，把DNA转移至新的96孔板中。**