

MagPure Plasmid EF 96 Kit

磁珠法低内毒素质粒抽提试剂盒

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.	P1814-01	P1814-02	P1814-03
Package	50 次	200 次	500 次
RNase A *	5 mg	10 mg	30 mg
Buffer P1	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer P2	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer LN3	7 ml	30 ml	80 ml
Buffer LN4	40 ml	200 ml	450 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	100 ml
MagPure Particles	1.8 ml	7 ml	18 ml

版本号：2019-01

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 P2/LN4 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 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。
- 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. 将含目的载体的菌种接种于含 1~5ml LB/抗生素培养液的 10~50ml 培养管中，37℃ 摇床培养 12~16 小时。10,000 × g 离心 1 分钟，收集 1~5ml 菌体。倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。
2. **加入 250µl Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋重悬细菌。**
使用前确保 RNase A 已加到 Buffer P1 中。彻底重悬细菌对产量很关键，重悬后应看不到细菌团块。
3. **加入 250µl Buffer P2，颠倒混匀 8~10 次，室温放置 1-2 分钟。**
轻轻颠倒混匀。涡旋会引起基因组 DNA 污染。溶液变得粘稠而透亮表明细菌已充分裂解。如有必要，室温放置 2 分钟，其间颠倒混匀几次。处理多个样品时，这一步操作时间不要超过 4 分钟。
4. **加入 125µl Buffer LEN3，立即颠倒 10~12 次让溶液彻底中和。**
加入 Buffer LEN3 后应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。
5. 13,000 × g 离心 10 分钟。
6. 转移 500µl 上清液至新的 1.5ml 离心管中。
7. **加入 250µl Buffer LN4、150µl 异丙醇和 30µl MagPure Particles 至样品中，颠倒混匀 15-20 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，吸弃或倒弃所有的溶液。
8. **加入 500µl Buffer LN4，涡旋混匀 15 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 900µl 80%乙醇，涡旋混匀 15 秒，转移至磁力架上吸附 1 分钟。**吸弃溶液。
10. **加入 900µl 80%乙醇，涡旋混匀 15 秒，转移至磁力架上吸附 1 分钟。**吸弃溶液。
11. 短暂离心，吸弃所有溶液，空气干燥 10 分钟。
12. **加入 40~100µl Elution Buffer，混匀 10 秒，室温静置 5 分钟，其间涡旋混匀数次。**
13. 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. 在 96 深孔板中，加入~1.4ml YT 培养液，将含质粒的 E. coli 接种于每个孔中，贴上可透气的封口膜或盖上盖子。37°C，220rpm 摇床培养 14~16 小时扩增质粒；
2. 3,000~5,000 × g 离心 15 分钟收集菌体。撕弃封口膜，把培养液倒弃到废液瓶中，并把深孔板反扣于吸水纸上，轻轻上下拍打几下以吸尽残液。
3. **每孔中加入 250µl Buffer P1/RNase A 混和液**，拍打并涡旋充分重悬细菌。
使用前，必须确保 RNase A 已经加到 Buffer P1 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。(建议使用 8 道 1ml 的移液枪来转移溶液)。
4. **每孔加入 250µl Buffer P2，贴上不透气的封口膜**。300~600RPM 振荡混匀 5 分钟。
混匀时，可快速颠倒混匀数次，或 300-600RPM 振荡混匀 5 分钟。Buffer P2 中含有 SDS，使用前检查 Buffer P2 中是否有沉淀形成。若有沉淀，可置于 37°C 溶解。这一步不能涡旋，涡旋会引起基因组 DNA 的污染。静置时间不要超过 5 分钟。
5. **撕弃封口膜，每孔中加入 125µl Buffer LEN3**，贴上不透气的封口膜，300~600RPM 振荡混匀 5 分钟。
6. 4,000~5,000 × g 离心 15 分钟。
7. 转移 500µl 上清液至新的 96 孔板中，加入 250µl Buffer LN4、150µl 异丙醇和 30µl MagPure Particles 至样品中，振荡混匀 3-5 分钟。
【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 LN4 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。
10. **加入 750µl 80%乙醇**。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 80%乙醇**。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。
13. 把 96 孔板正放，37~45°C 进一步干燥 15 分钟。
14. 加入 100 μ l Elution Buffer，1,200rpm 振荡混匀 3~5 分钟。
15. 转移至磁力架上吸附 3 分钟，把 DNA 转移至新的 96 孔板中。

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 Buffer E1/RNase A 中充分重悬，成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **Buffer LNP4 体积**：Buffer LNP4 加入量是上清体积的 0.8 倍。
- **低拷贝数和长片段载体**：本产品对低拷贝数和长片段的载体(>8KB)抽提效率较低，建议使用 magen 公司的 HiPure Plasmid/BAC EF Kits 进行抽提。

2. RNA 污染

- **RNase 的用量和保质期**：RNase A 加入量为常规产品的 5 倍，使用时 Buffer P1/RNase 不要与其产品交互使用。Buffer P1/RNase 保存时间不要超过 6 个月。
- **菌液培养时间**：本产品对 RNA 污染较为敏感，建议细菌培养时间为 16~18 小时，以降低菌液中 RNA 的丰度。