

MagPure Plasmid EF HC Kit

低内毒素质粒小提大量试剂盒

本产品适合于从 5ml 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 30 μ g，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	P1817-01	P1817-02	P1817-03
包装次数	48 次	96 次	5 x 96 次
RNase A	10 mg	10 mg	30 mg
Buffer P1	15 ml	30 ml	150 ml
Buffer P2	15 ml	30 ml	150 ml
Buffer N3	15 ml	30 ml	150 ml
Buffer ER2	5 ml	10 ml	40 ml
Buffer PW1	20 ml	40 ml	160 ml
Bind Beads	20 ml	40 ml	160 ml
Buffer TE	10 ml	10 ml	20 ml

版本号：2021-05-11

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 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 会有沉淀形成，55 $^{\circ}$ C 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 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 E1 中，于 2-8°C 保存，有效期为 6 个月。
- 灭菌的 1.5ml 离心管，用于收集 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。

实验步骤

1. 将含目的质粒的菌种接种于含有~5ml LB/抗生素培养基的 50ml 培养管中，37°C 摇床培养 12-16 小时小量扩增菌液。

不要用 TB 或 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。

2. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集~5ml 菌液。
3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。**加入 0.25ml Buffer P1/RNase A**，高速涡旋重悬细菌。
4. **加入 0.25ml Buffer P2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。**室温放置 3~5 分钟，其间偶尔颠倒混匀 2~3 次。

轻轻颠倒混匀，不要涡旋。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。处理多个样品时，总操作时间不要超过 5 分钟。

5. **加入 0.25ml Buffer N3 至裂解液中，颠倒混匀 15~25 次或直至样品充分混匀。**

加入 Buffer N3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。菌液用量较多时，中和也会较难进行，中和时需要稍用力颠倒数次至溶液彻底中和。

6. 13,000 × g 离心 10 分钟。
7. 转移上清液新的离心管中，加入 0.1 倍体积 Buffer ER2 至滤液中，颠倒混匀，冰上放置 10~15 分钟，其间颠倒混匀 1~2 次。

8. 42~50°C 水浴 5 分钟。立即于室温下，13,000 ×g 离心 3 分钟。
9. 从离心机中轻轻取出样品，不要让下层红色的溶液悬浮到上清中。转移 0.6ml 上清液至新的离心管中。
10. **加入 300µl Bind Beads，涡旋混匀 10 秒，静置 3~5 分钟，其间颠倒混匀数次。**转移至磁力架上吸附 3 分钟，吸弃或倒弃所有的溶液。
11. (可选，彻底去除 RNA 污染)**加入 300µl Buffer PW1，涡旋混匀 15 秒，**转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。
12. **加入 500µl 75%乙醇，涡旋混匀 15 秒，**转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。
13. (可选)重复第 12 步一次。
14. 短暂离心，吸弃所有溶液，空气干燥 5 分钟。
15. **加入 50~80µl 灭菌水，混匀 20 秒，室温静置 3 分钟。**
16. 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。

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。

2. RNA 污染

- **RNase 的用量和保质期：** RNase A 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，建议细菌培养时间为 12-16 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。