MagPure Plasmid DNA EF Midi Kit

磁珠法质粒 DNA 提取试剂盒(转染级)

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 500μg 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
小量过滤器(10ml)	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 60μl 磁珠 MP 样品孔(2)：0.64ml Buffer E4 Plus 和 60μl 磁珠 MP 样品孔(3)：0.64ml Buffer E4 Plus 和 60μl 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 SW2		

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 本产品室温运输和保存，有效期 18 个月。

产 品 组 份

货 号	P1815-M8-8B	P1815-M8-48B	P1815-M8-96B
RNase A	5 mg	30 mg	80 mg
Buffer E1	25 ml	140 ml	270 ml
Buffer E2	25 ml	140 ml	270 ml
Buffer E3	25 ml	140 ml	270 ml
Buffer E4 Plus	25 ml	140 ml	270 ml
Buffer ETR	25 ml	140 ml	270 ml
Buffer EWB	25 ml	140 ml	270 ml
Buffer PW2	6 ml	50 ml	100 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	60 ml
小量过滤器 10ml	8 个	48 个	96 个
磁珠 MP	1.6 ml	10 ml	20 ml
洗脱条	2 条	12 条	24 条
磁棒套	2 条	12 条	24 条
48 孔板	2 板	12 板	24 板

保 存 条 件 本产品室温运输和保存，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 P1/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 P2，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。水平转子离心机:，3,000-5,000 x g 离心 15 分钟收集细菌。

7. **缓慢取出过滤器活塞，把第 6 步的上清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，按第二部分提取转染级质粒 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 x g 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	1	55
11	弃磁	6	2.2	60	8	1min		0	0	0	自动	/	/