

MagPure Plasmid EF 96 Kit

磁珠法转染级质粒试剂盒

产品组分

Cat.No.	P1814-01	P1814-02	P1814-03
纯化次数	50 次	200 次	500 次
RNase A *	5 mg	10 mg	20 mg
Buffer P1	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer P2	15 ml	60 ml	150 ml
Buffer LEN3	7 ml	30 ml	80 ml
Buffer MN4	15 ml	70 ml	180 ml
Buffer PW1	40 ml	140 ml	350 ml
Buffer EWB	40 ml	140 ml	350 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	60 ml
MagPure Particles N	3.0 ml	11 ml	27 ml

货号		P1814-F-48	P1814-F-96
纯化次数		48 次	96 次
RNase A *		5 mg	10 mg
Buffer P1		15 ml	30 ml
Buffer P2		15 ml	30 ml
Buffer LEN3		10 ml	15 ml
磁力套		1 个	1 个
样品板	300µl Buffer MN4	1 个	1 个
清洗板1	500µl Buffer PW1	1 个	1 个
清洗板2	500µl Buffer EWB	1 个	1 个
清洗板3	900µl Buffer PW2&40µl磁珠MPN	1 个	1 个
洗脱板	80µl Elution Buffer (Endo Free)	1 个	1 个

产品介绍

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转染级质粒 DNA。纯化的质粒产量高达 20 μ g，内毒素含量 <50EU/ μ g，浓度高达 0.5 μ g/ μ l，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。

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/LN4 会有沉淀形成，55 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 6 个月。

方案 1. 单管式操作

1. **13,000 \times 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 $^{\circ}$ C 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 \times YT 或 TB 培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过 2.5ml。2 \times 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 P1/P2/NP3 的体积。
- 2 **加入 260 μ l Buffer P1/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 P1。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 260 μ l Buffer P2，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 130 μ l Buffer LEN3，立即颠倒10~15次直至形成蛋花状悬浊液，13,000 x g 离心 10 分钟。
- 5 转移500 μ l上清液至新的1.5ml离心管中。
- 6 加入300 μ l Buffer MN4和20~40 μ l MagPure Particles N，颠倒混匀15-20次，静置5分钟，其间颠倒混匀数次，转移至磁力架上吸附1分钟，吸弃或倒弃所有的溶液。
若产量总量不超过10 μ g时，加入20 μ l MagPure Particles N，若产量在10~20 μ g时，加入30 μ l MagPure Particles N；若产量超过20 μ g时，加入40 μ l MagPure Particles N。
- 7 加入500 μ l Buffer PVW1，涡旋混匀15~30秒，磁力架吸附1分钟，吸弃溶液。
- 8 加入500 μ l Buffer EVWB，涡旋混匀15~30秒，磁力架吸附1分钟，吸弃溶液。
- 9 加入750 μ l 80%乙醇，涡旋混匀15秒，磁力架上吸附1分钟，吸弃溶液。
- 10 加入750 μ l 80%乙醇，涡旋混匀15秒，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 通道提取仪操作

1. 预分装试剂：颠倒 96 孔板让磁珠充分悬浮，正放 1 分钟后，去除封口袋和封口膜。
2. 按方案 1 准备上清液。
3. 在样品板中，加入 500 μ l 上清液。
4. 把磁力外套插到仪器中，把 96 孔板放到仪器中(A1 孔按左内角放置)。
5. 约 30 分钟，提取结束，取出 96 孔板和磁力外套。
6. 把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中，把产物保存于-20~8 $^{\circ}$ C。

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	吸磁	4	500	0.5 min	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
2	结合	1	850	6 min	8	0	0	90s	15	15	自动	/	/
3	清洗1	2	600	1 min	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
4	清洗2	3	600	1 min	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
5	清洗3	4	900	1 min	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
6	干燥	6	600	0	0	8 min		0	0	0	自动	/	/
7	洗脱	6	100	6 min	8	0	0	60s	0	30	自动	/	/
8	弃磁	3	900	0.5 min	8	0	0	0	0	0	自动	/	/
9	干燥	6	600	0	0	1 min		0	0	0	自动	/	/
10	吸磁	6	100	1 min	8	0	0	60s	0	30	自动	/	/
11	弃磁	3	900	0.5 min	8	0	0	0	0	0	自动	/	/