

MagPure Plasmid LQ Kit

磁珠法质粒小提试剂盒

本产品采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，适合于从 1~3ml 细菌培养液中提取高达 20 μ g 的质粒 DNA。纯化的质粒可直接用于自动测序、酶切、PCR 和标记等。20 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

产 品 编 号	P1811-01	P1811-02	P1811-03	P1811-04
包装次数	50 次	200 次	500 次	5000 次
RNase A	5 mg	20 mg	60 mg	2 x 200 mg
Buffer P1	15 ml	60 ml	140 ml	2 x 680 ml
Buffer P2	15 ml	60 ml	140 ml	2 x 680 ml
Buffer N3	15 ml	60 ml	140 ml	2 x 680 ml
Buffer PW1	15 ml	60 ml	140 ml	2 x 680 ml
Bind Beads	15 ml	60 ml	140 ml	2 x 680 ml

版本：202401

保 存 条 件

本产品除 RNase A 外，其它组份可在室温（15-25℃）保存 18 个月。RNase A 室温运输，收到产品后把 RNase A 保存于-20-8℃。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成。使用前 37℃ 水浴使沉淀完全溶解。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8℃ 保存 6 个月。

准 备 事 项

加入 0.2~0.5ml Buffer P1 至 RNase A 干粉中，吸打混匀 5~10 次让 RNase A 干粉充分溶解，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。

方案 1. 单管式操作

- 1. 13,000 × g 离心 1 分钟，收集 1~3ml 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 1~3ml 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 1.5ml。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。
- 2 加入 200μl 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 200μl 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。若溶液未能变得清亮，可能菌体过多而裂解不彻底，下次实验减少菌体用量或增加 Buffer P1, Buffer P2 和 Buffer N3 用量。
- 4 加入 200μl Buffer N3，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。13,000 × g 离心 10 分钟。**

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。
- 5 转移 500 μl 上清液至新的 1.5ml 离心管中，加入 0.5 倍体积的 Bind Beads，颠倒混匀 6-8 次，静置 3~5 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。**
- 6 加入 250μl Buffer PW1，涡旋混匀 10 秒，转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。**

Buffer PW1 清洗可以充分去除 RNA 污染，让 OD 读数更为真实，但 PW1 清洗后超过 10ug 的质粒会被清洗，处理高拷贝载体时，可以根据实验要求，选择 PW1 清洗或不清洗的步骤。
- 7 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。**
- 8 (可选)重复第 7 步一次。**
- 9 短暂离心，吸弃所有溶液，空气干燥 5~10 分钟。**
- 10 加入 50~100μl 灭菌水，混匀 15 秒，室温静置 3 分钟。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 孔板高通量手工提取

1. 在96孔2.2ml深孔板(自配)中, 加入1.0~1.3ml 2 × 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20~24小时扩增质粒。2,500~4,000 × g 离心10分钟收集菌体, 撕弃封口膜, 倒弃培养液, 把96孔板反扣于吸水纸上, 轻轻拍打几下以吸尽残液。
2. 每孔中加入200μl Buffer P1/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 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。若有96孔板涡旋仪如IKA MS3等, 最高速度涡旋3-5分钟。
3. 每孔中加入200μl Buffer P2, 贴上封口膜, 温和地上下颠倒混匀6-8次, 短暂离心收集孔口的液滴, 室温放置2分钟。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等, 300~600rpm低速振荡3~5分钟。
4. 撕去封口膜, 每孔加入200μl Buffer N3, 贴上封口膜, 立即温和地上下颠倒混匀10-15次, 短暂离心收集孔口的液滴。3,000~4,000 × g 离心20分钟。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等, 300~600rpm低速振荡5分钟。
5. 用8通道移液枪转移适量的上清液至新的1.1ml或2.2ml的96孔板中。
若用移液工作站或96孔板涡旋仪时 (IKA MS3)等, 300~600rpm低速振荡5分钟。这一步建议转移400-500μl上清液, 损失少量的上清液是有必要的, 以免转移过多的杂质。
6. 加入0.5倍体积的Bind Beads, 放置于IKA MS3涡旋仪上, 700~900rpm振荡3分钟。室温放置10分钟。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
7. 加入250μl Buffer PW1, 700~900rpm振荡1分钟。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。
8. 加入500μl 75%乙醇, 放置于IKA MS3涡旋仪上, 700~900rpm振荡1分钟。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。
9. 重复第8步一次。
10. 让磁力架和96孔板反扣于吸水纸3分钟彻底吸尽残液, 空气干燥15分钟。
11. 加入40~100μl灭菌水, 700~900rpm振荡混匀5分钟。转移至磁力架上吸附3分钟, 把DNA转移至新的96孔板中。

方案 3. 移液工作站流程

1. 在 96 孔 2.2ml 深孔板(自配)中, 加入 1.0~1.3ml 2 × 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 20~24 小时扩增质粒。
2. 2,500~4,000 × g 离心 10 分钟收集菌体, 撕弃封口膜, 倒弃培养液, 把 96 孔板反扣于吸水纸上, 轻轻拍打几下以吸尽残液。撕弃封口膜, 倒弃培养液, 并把 96 孔板反扣于吸水纸上, 轻轻拍打几下以吸尽残液。
3. 每孔中加入 200μl Buffer P1/RNase A 混和液, 最高速度振荡 3-5 分钟重悬细菌。
4. 加入 200μl Buffer P2, 600rpm 振荡混匀 5 分钟。
5. 加入 200μl Buffer N3, 800rpm 振荡混 3 分钟, 1200rpm 振荡温育 1~2 分钟。3,000~5,000 × g 离心 20 分钟。
6. 转移 500μl 上清液至新的 96 孔板中, 加入 250μl Bind Beads 至样品中, 700~900rpm 振荡混匀 2-3 分钟, 静置 5 分钟。转移至 96 孔磁力架上吸附 3 分钟, 吸弃所有的溶液。
7. 加入 250μl Buffer PW1, 700~900rpm 振荡 60 秒, 转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。
8. 加入 500μl 75%乙醇, 700~900rpm 振荡 60 秒, 转移至磁力架上吸附 2 分钟。吸弃溶液。
9. 重复第 8 步一次, 彻底吸弃残液, 空气干燥 10 分钟。
10. 加入 50~100μl 灭菌水, 振荡混匀 200 秒。转移至磁力架上吸附 2 分钟, 把 DNA 转移至新的 96 孔板中。