

MagPure Plasmid DNA Maxi EF Kit

磁珠法无内毒素质粒 DNA 大量预装试剂盒

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 100~200ml 细菌培养液中提取高达 2000µg 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-M4-4                                                                                                                                                                                                                           | P1815-M4-12 | P1815-M4-24 |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| RNase A      | 10 mg                                                                                                                                                                                                                                | 30 mg       | 50 mg       |
| Buffer E1    | 30 ml                                                                                                                                                                                                                                | 100 ml      | 180 ml      |
| Buffer E2    | 30 ml                                                                                                                                                                                                                                | 100 ml      | 180 ml      |
| Buffer E3    | 30 ml                                                                                                                                                                                                                                | 100 ml      | 180 ml      |
| Buffer ER2   | 10 ml                                                                                                                                                                                                                                | 30 ml       | 60 ml       |
| Buffer BCP   | 10 ml                                                                                                                                                                                                                                | 30 ml       | 60 ml       |
| 大量过滤器 B      | 4 个                                                                                                                                                                                                                                  | 12 个        | 24 个        |
| 磁棒套          | 4 条                                                                                                                                                                                                                                  | 12 条        | 24 条        |
| 预装试剂         | 1 板                                                                                                                                                                                                                                  | 3 板         | 6 板         |
| 24 孔高板预装试剂内容 | 样品孔(1): 2.0 ml Buffer E4 Plus 和 160µl 磁珠 MP<br>样品孔(2): 2.0 ml Buffer E4 Plus 和 160µl 磁珠 MP<br>清洗孔(3): 2.0 ml Buffer E4 Plus 和 160µl 磁珠 MP<br>清洗孔(4): 8.0 ml Buffer ETR<br>清洗孔(5): 8.0 ml Buffer GW2<br>洗脱孔(6): 800 µl Elution Buffer |             |             |

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 搅拌均匀，在搅拌条件下分装 2.2 ml 混合液至 1/2/3 孔中。

**保存条件** 本产品室温运输，除 Buffer BCP 于 2~8℃ 保存，其他组分室温保存，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。

## 第一部分：实验步骤（转染级）

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 6~8 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 0.5~1L 培养瓶中加入 150~200ml 含抗生素 LB 培养液，移液器 0.1~0.15ml 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 12~15 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)，OD<sub>600</sub> 应该在 2.0-3.0。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。若 YT/TB 培养液培养后，菌液量为 50~75ml，过多的菌液会造成碱裂解不充分。

3. **菌体收集：**转移 150~200ml 培养液到适合的离心管中，8,000rpm 离心 5 分钟。

水平转子离心机：，3,000-5,000 × 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 7.0ml Buffer E1/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的菌块。若涡旋未能充分打散菌块，用移液器吸打数次。

5. **菌体裂解：**加入 7.0ml Buffer E2，温和地上下颠倒并转动离心管 15~20 次。室温静置 3 分钟，其间颠每隔 1 分钟温和地颠倒 6-8 次让细胞充分裂解。

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，并轻轻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 7.0ml Buffer E3 至裂解液，上下颠倒混匀 20~30 次或直至形成蛋花状分散的悬浊液。

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，并轻轻振荡让大块沉淀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。

7. **除杂质：**8,000rpm 离心 10 分钟。

更简化流程时，第 7 步可以省略离心。

8. **取出过滤器的活塞，把第 7 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）。把活塞插入过滤器。推动活塞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 或按第 9 步提取无内毒素质粒 DNA。

若第 7 步不离心，把混合液全部倒入针筒中，静置 5-10 分钟让沉淀物漂浮到溶液表面，然后再插入活塞并推动，让溶液滤出。

9. **可选，进一步除内毒素：**加入 0.1 倍体积的 Buffer ER2 至滤液中，颠倒 10-15 次，冰上或 2-8 度放置 10 分钟，其间颠倒数次。加入 0.1 倍体积的 Buffer BCP，快速上下振荡 15 秒，室温下，8,000rpm 离心 10 分钟得上清液，按第二部分提取无内毒素质粒 DNA。

第二部分: 4 通道核酸提取仪操作

- 1. 预分装试剂: 先振荡 24 孔板让磁珠充分悬浮, 轻轻拍打数次, 让液体流回孔中, 正放 5~10 分钟或直至孔 1/2/3 中泡沫消化后, 去除封口袋和封口膜。
- 2. 打开磁力外套的夹具, 把磁力套卡在磁力架夹具中, 并插到仪器中。
- 3. 在第 1,2,3 排孔, 分别加入 6.5~6.6ml 上清液 (按第一部分准备), 然后放在仪器中。
- 4. 编写程序, 并启动对应程序。
- 5. 约 50 分钟, 结束, 取出 24 孔板和磁力外套。
- 6. 把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中。
- 7. 若转移 DNA 溶液中含有磁珠污染, 于 13,000 xg 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℃。  
(受磁珠和磁套的粘稠损失, 800ul 洗脱, 实得 660-680ul)。

| 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  | 混匀1  | 1  | 8   | 100  | 7  | 0      | 0  | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 2  | 混匀2  | 2  | 8   | 100  | 7  | 0      | 0  | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 3  | 混匀3  | 3  | 8   | 100  | 7  | 0      | 0  | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 4  | 结合1  | 1  | 8   | 120  | 7  | 0      | 0  | 150  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 5  | 结合2  | 2  | 8   | 120  | 7  | 0      | 0  | 150  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 6  | 结合2  | 3  | 8   | 120  | 7  | 0      | 0  | 150  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 7  | 清洗1  | 4  | 8   | 150  | 7  | 0      | 0  | 100  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 8  | 清洗2  | 5  | 8   | 150  | 7  | 0      | 0  | 100  | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 9  | 干燥   | 6  | 0.8 | 0    | 0  | 10 min |    | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |
| 10 | 洗脱   | 6  | 0.8 | 360s | 9  | 0      | 0  | 60   | 0  | 50 | 自动 | 6  | 55 |
| 11 | 弃磁   | 5  | 8   | 0.5  | 8  | 0      | 0  | 0    | 0  | 0  | 自动 | /  | /  |