

MagPure Plasmid DNA Midi EF Kit

磁珠法无内质粒 DNA 大提预装试剂盒

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 50~75 ml 细菌培养液中提取中低拷贝的去内毒素质粒 DNA，最高产量可达 500µg，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	P1818-M24-24	P1818-M24-48	P1818-M24-96
RNase A	10 mg	20 mg	20 mg
Buffer P1	70 ml	150 ml	280 ml
Buffer P2 Blue	85 ml	170 ml	350 ml
Buffer LEN3	45 ml	85 ml	170 ml
Buffer MN4	85 ml	170 ml	350 ml
MagPure Particles	15 ml	30 ml	60 ml
24 高板磁套	1 套	2 套	4 套
24 孔高板 预装试剂内容	样品板(高板): 空 除杂板 1(矮板): 4.0 ml Water 清洗板 2(矮板): 5.0 ml Buffer LMN5 清洗板 3(矮板): 5.0 ml Buffer GW2/1ml MP 清洗板 4(矮板): 5.0 ml Buffer GW2 洗脱板 5(矮板): 500 µl Buffer AE		

备注：取 1ml 磁珠 MP，吸弃水份，加入 5ml Buffer GW2 重悬后分装。

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 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℃ 保存，有效期为 6 个月。

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 0.5L 培养瓶中加入 50~75ml 含抗生素 LB 培养液，移液器 0.1ml 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。

3. **菌体收集：**转移 50~75ml 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:4,000 × g 离心 10 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 2.5 ml Buffer P1/RNase A 至菌体中，高速涡旋重悬细菌，转移至 24 孔板样品板中，并每孔加入 500ul MagPure Particles 混匀。

5. **菌体裂解：**加入 3.0 ml Buffer P2 Blue，放置于板式涡旋仪，400-600rpm 振荡 5 分钟。

6. **菌体中和：**加入 1.5 ml Buffer LEN3 至裂解液，放置于板式涡旋仪，600~800rpm 振荡 2 分钟，然后 800-1000rpm 振荡 3 分钟形成蛋白状的黑色悬液。

7. **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，去除封口袋和封口膜。

8. **上机操作：**把 24 孔磁套放置于仪器中，把对应的 24 孔放置到相应的位置。编写程序，并启动对应程序。

9. **暂停加液：**约 10 分钟暂停，取出样品板，每孔 3ml Buffer MN4，继续执行程序。

10. 约 30 分钟结束。把 DNA 转移至 1.5ml 离心管中。
11. 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℃。

受磁珠和磁套的粘附损失，600ul 洗脱液实得 500ul。若质粒产量超过 0.5mg，转移出洗脱液，再加入 0.5ml Buffer AE 或 Elution Buffer 至第 6 排孔中，重复运作程序进行第二次结合，最后合并两次洗脱液。

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	吸杂	1	8	120	6	0	0	120	0	0	自动	/	/
2	除杂	2	5	30	7	0	0	0	0	0	自动	/	/
3	吸杂	1	8	120	7	0	0	180	0	0	自动	/	/
4	除杂	2	5	60	7	0	0	0	0	0	自动	/	/
5	暂停	1	8	0	7	暂停		0	0	0	自动	/	/
6	吸磁	4	5	60	7	0	0	100	0	0	自动	/	/
7	结合	1	8	420	7	0	0	200	0	0	自动	/	/
8	清洗	3	5	150	7	0	0	120	0	0	自动	/	/
9	清洗	4	5	120	7	0	0	120	0	0	自动	/	/
10	清洗2	5	5	120	7	0	0	120	0	0	自动	/	/
11	干燥	6	0.5	0	0	10 min		0	0	0	自动	/	/
12	洗脱	6	0.5	300	9	0	0	90	0	60	自动	/	/
13	弃磁	5	5	60	8	0	0	0	0	0	自动	/	/