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	10 ml	30 ml	80 ml
Buffer MN4	20 ml	70 ml	180 ml
Buffer LMN5	40 ml	140 ml	350 ml
Buffer EWB	40 ml	140 ml	350 ml
Elution Buffer	10 ml	30 ml	60 ml
MagPure Particles	2.0 ml	7 ml	17 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
MagPure Particles		2 ml	4 ml
磁力套		1 个	1 个
样品板	300μl Buffer MN4	1 个	1 个
清洗板1	500μl Buffer LMN5	1 个	1 个
清洗板2	500μl Buffer EWB	1 个	1 个
清洗板3	900μl Buffer PW2&30ul磁珠MP	1 个	1 个
清洗板4	900μl Buffer PW2	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 15ug，内毒素含量<50EU/μg，浓度高达 0.5μg/μl，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：本产品室温下保存 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 次使之充分溶解，然后全部转移至 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 1~5ml 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℃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 x YT或TB培养液因菌体密度很高，菌液用量不应超过2.5ml。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。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/LEN3的体积。

2. **加入 260μl 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260μl 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，并轻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 130μl Buffer LEN3，立即颠倒10~15 次直至形成蛋花状悬浊液，13,000×g 离心 10 分钟。**

5. **转移500μl上清液至新的1.5ml离心管中。**

6. **加入300μl Buffer MN4和30μl MagPure Particles，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10μg时，加入20μl MagPure Particles ，若产量在10~20μg时，加入30μl MagPure Particles .

7. **加入500μl Buffer LMN5，涡旋混匀15~30秒，**磁力架吸附1分钟，吸弃溶液。

8. **加入500μl Buffer EWB，涡旋混匀15~30秒，**磁力架吸附1分钟，吸弃溶液。

9. **加入900μl 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900μl 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50~100μl 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. **96孔板培养：**在2.2ml深孔板(自备)，每孔加入1.3ml LB或YT培养液，接种单克隆菌斑，贴上透气封口膜，37°C，220~280rpm摇床培养16小时扩增质粒。

2. **2,500 x g离心10分钟收集细菌。**倒去培养基，然后倒置于吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。此时样品可以密封并在-20~-80°C下冷冻以便后续处理。

3. **每孔中加入260μl 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。若用移液工作站或板式涡旋仪(如IKA MS3)等，最高速度涡旋3-5分钟或直至菌体充分重悬。24孔培养时，重悬后把4个24孔板的重悬液合并至96孔板。
   采用移液工作站进行全自动提取时，可以采用磁珠法除杂质，加入30μl MagPure Particles重悬液中，Buffer P1/RNase和MagPure Particle可以预先配制成混合液，按280μl Buffer P1加30μl MagPure Particles的比例进行预混，该混和液可2-8度放置6个月。采用磁珠法除杂质时，LB培养液建议不要超过3ml。
   移液工作站或96孔板涡旋仪（IKA MS3)：最高速度振荡5~10分钟使细菌充分重悬。

4. **每孔中加入260μl Buffer P2，贴上封口膜，温和地上下颠倒混匀10-15次，短暂离心收集孔口的液滴，室温放置2~3分钟。**
   移液工作站或96孔板涡旋仪（IKA MS3)：400~700rpm低速振荡3~5分钟。

5. **撕去封口膜，每孔加入130μl Buffer LEN3，贴上封口膜，立即上下颠倒混匀10-15次，1000-1200rpm振荡2分钟让大块沉淀分散。**
   移液工作站或96孔板涡旋仪（IKA MS3)：600~800rpm低速振荡3分钟，1000-1200rpm振荡2分钟使大块沉淀分散成小块沉淀或蛋白花沉淀块，以方便下一步的除杂操作。

6. **选择合适的方案去除中和后形成的杂质。**

离心除杂: 4,000~4,500 x g离心20分钟沉淀杂质，用移液器或移液工作站缓慢地从最高液面位置吸取上清液（~500μl）。通常20分钟离心足以沉淀絮状物，如果絮状物没有紧密地附着在孔底则应增加离心时间

离心过滤除杂：把96过滤板B（另外订购，M064-01）放置于96孔1.6~2.2ml板中，转移全部混合液至过滤板中，4,000 x g离心3分钟过滤去除杂质得到澄清的滤液。

负压抽滤除杂：把把96过滤板（另外订购，M064-01）放置于负压抽滤盒中，底部放入96孔1.6-2.2ml收集板，转移全部混合液至过滤板中，打开负压装置进行抽滤得到澄清的滤液。

磁珠法除杂：进行磁珠法除杂时，第3步必须加入30μl MagPure Particles，中和后磁珠和絮状沉淀结合在一起，形成有磁性的沉淀物。把样品放置在96孔磁力架上静置3-5分钟将磁珠和杂质吸附在侧壁或底部，然后用缓慢吸液方式转移出适量的上清液（~500μl）。

7. 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。

8. **转移500μl上清液至样品板。**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)。

9. 约30分钟，提取结束，取出96孔板和磁力外套。

10. 把DNA转移至1.5ml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	吸磁	4	500	0.5 min	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
2	结合	1	800	7 min	8	0	0	60s	0	0	自动	/	/
3	清洗1	2	600	1 min	8	0	0	50s	0	0	自动	/	/
4	清洗2	3	600	1 min	8	0	0	50s	0	0	自动	/	/
5	清洗3	4	900	1 min	8	0	0	50s	0	0	自动	/	/
6	清洗4	5	900	1 min	8	0	0	50s	0	0	自动	/	/
7	干燥	6	600	0	0	8 min		0	0	0	自动	/	/
8	洗脱	6	100	6 min	8	0	0	60s	0	30	自动	/	/
9	弃磁	3	500	0.5 min	8	0	0	0	0	0	自动	/	/