

MagPure Plasmid EF HC Kit

低内毒素质粒小提大量试剂盒

本产品适合于从 50ml 细菌培养液中提取高浓度的低内毒素质粒 DNA。试剂盒采用独特的溶液体系和改良硅胶膜抽提体系，质粒产量可高达 1mg，内毒素含量 < 1EU/ μ g，浓度高达 3 μ g/ μ l。得到的质粒可直接用于细胞转染和动物注射等。

产品组份

产品编号	P1815-02	P1815-03
包装次数	10 次	50 次
RNase A	10 mg	30 mg
Buffer E1	30 ml	120 ml
Buffer E2	30 ml	120 ml
Buffer E3	30 ml	120 ml
Buffer E4	30 ml	120 ml
Buffer E5	15 ml	60 ml
Buffer PW1	15 ml	60 ml
Buffer PW2*	10 ml	50 ml
Buffer TE	15 ml	30 ml
Clear Midi Syringe	10	50
MagPure Particles E	2.5 ml	11 ml

版本号：2021-05-11

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℃。低温下，Buffer E2/E4 会有沉淀形成，55℃ 水浴使沉淀完全溶解后使用。

准备事项

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer PW2，于室温保存。
- 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。
- 灭菌的 1.5ml 离心管，用于收集 DNA。
- LB 培养液和相应的培养管或培养瓶。
- 低温下，Buffer E4 有沉淀析出，于 55℃ 水浴溶解。

实验步骤

1. 将含目的质粒的菌种接种于含有 1ml LB/抗生素培养基的 10ml 培养管中，37℃ 摇床培养 6~8 小时小量扩增菌液。
2. 在 200ml 培养瓶中加入 50ml 含抗生素 LB 培养液，接种 0.1% 初级菌液至培养瓶中，37℃ 摇床培养 14~16 小时扩增菌液。

不要用 TB 或 YT 等丰富培养基进行培养细菌。使用 TB/YT 培养基时，会导致 RNA 去除不干净。

3. 3,000~5,000 × g 离心 10 分钟，收集 30~50ml 菌液。
4. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打以吸尽残液。加入 2.0ml Buffer E1/RNase A，高速涡旋重悬细菌。
5. 加入 2.0ml Buffer E2 至重悬液中，颠倒混匀 8~10 次。室温放置 3~5 分钟，其间偶尔颠倒混匀 2~3 次。

轻轻颠倒混匀，不要涡旋。充分裂解后，溶液变得粘稠而透亮。处理多个样品时，总操作时间不要超过 5 分钟。

6. 加入 2.0ml Buffer E3 至裂解液中，颠倒混匀 15~25 次或直至样品充分混匀。

加入 Buffer E3 后，应立即颠倒混匀，以防止沉淀团聚而影响中和效果。菌液用量较多时，中和也会较难进行，中和时需要稍用力颠倒数次至溶液彻底中和。

7. 3,000~5,000 x g 离心 5 分钟。
8. 取出过滤器(Clear Midi Syringe)活塞，把第七步的上清倒入过滤器中（倒入沉淀不影响结果）。把过滤器的出水口对准已准备好的 15ml 离心管。把活塞插入过滤器。推动活塞使裂解液过滤到 15ml 离心管中。
9. 测量滤液体积，加入 1/3 倍体积 Buffer E4(~1.7ml)和 200ul MagPure Particles E，颠倒混匀 6~8 次，室温放置 10 分钟，其间颠倒混匀数次。
10. 3,000 x g 离心 3 分钟收集磁珠，小心倒弃上清液。
11. 加入 1ml Buffer E5(高拷贝数，超过 100ug)或 1ml Buffer PW1(低拷贝数，低于 100ug)至磁珠中，涡旋 15 秒重悬磁珠。3,000 x g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。
12. 加入 4ml Buffer PW2(已加乙醇稀释)至磁珠中，涡旋 15~30 秒重悬磁珠，3,000 x g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。
13. 短暂离心收集残液，吸尽残液。
14. 55 度干燥 5~10 分钟。
15. 加入 300~500ul Buffer TE 至磁珠中，涡旋重悬磁珠，室温放置 10 分钟，其间混匀数次。
16. 3,000 x g 离心 3 分钟收集磁珠，转移上清液至新的离心管中。

常见问题

1. DNA 产量低

- **质粒拷贝数:** 载体因拷贝数差异会造成质粒产量明显的波动。高拷贝数的载体常有 2~3 倍的产量波动, (每毫升培养过夜的菌液, 高拷贝数的质粒载体产量为 4~16 μ g)。长片段质粒(>8KB)和表达型载体常以中低拷贝数为主, 每毫升菌液的产量约为 0.5~2 μ g。
- **菌种问题:** 菌种保存过程中存在质粒丢失现象, 养菌前最好先划线活化, 以稳定产量。
- **细胞未充分裂解:** 细菌须在 Buffer E1/RNase A 中充分重悬, 成团的细菌因无法裂解会降低产量。
- **低温离心:** 加入 Buffer E4 后, 不能低温放置或低温离心。
- **试剂准备有误:** Buffer E4 不能低温放置, Buffer E2/E4 若有沉淀析出需加热溶解。Buffer PW2 没有加入乙醇稀释或体积不准确(乙醇浓度需控制在 80%)。
- **Buffer E4 体积:** Buffer E4 加入量是上清体积的 1/3。过多或不足的 Buffer E4 会导致产量的波动。

2. RNA 污染

- **RNase 的用量和保质期:** RNase A 保存于 2~8 度, 长期保存时放置于-20 度。
- **菌液培养时间:** 本产品对 RNA 污染较为敏感, 建议细菌培养时间为 12-16 小时, 以降低菌液中 RNA 的丰度。
- **去除 RNA 污染:** 处理某些菌液时, 得到的质粒可能存在 RNA 污染, 通过醇类重沉淀可以去除 RNA。