

# MagPure Plasmid LQ Kit B

## 磁珠法质粒小提试剂盒 B

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 1~3ml 细菌培养液中提取高达 20 $\mu$ 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	P1811-01B	P1811-02B	P1811-03B	P1811-04B
包装次数	50 次	200 次	500 次	5000 次
RNase A	10 mg	40 mg	120 mg	2 x 600 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
Blue Plus	60 $\mu$ l	0.25 ml	1 ml	6 ml

### 保存条件

本产品除 RNase A 外，其它组份可在室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 保存 18 个月。RNase A 室温运输，收到产品后把 RNase A 保存于 -20-8 $^{\circ}$ C。低温下，Buffer P2 可能会有沉淀形成。使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀完全溶解。当 RNase A 加入 Buffer P1 后，可在 2-8 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 6 个月。
- (可选)Blue Plus 特殊的颜色反应，有利于监控碱裂解过程。Blue Plus 可预先添加到 Buffer P1 中。由于 Blue Plus 不溶解于 Buffer P1 中，添加 Blue Plus 后，Buffer P1 会产生少量沉淀，使用前要摇匀。按 1ml Buffer P1 加入 4 $\mu$ l Blue Plus。

## 方案 1. 单管式操作

1. 将含目的载体的菌种接种于含 1~3ml LB/抗生素培养液的 10~20ml 培养管中，37°C 摇床培养 12~16 小时。
2. 10,000 × g 离心 1 分钟，收集 1.5~5ml 菌体。
3. 倒弃培养基，在吸水纸上轻轻拍打吸尽残液。**加入 250µl Buffer P1/RNase A 混和液，高速涡旋重悬细菌。**  
彻底重悬细菌对产量很关键，充分重悬后应看不到细菌团块。Blue Plus 可以预先加入 Buffer P1/RNase A，以起到监控裂解的作用。按每 ml Buffer P1 加入 4µl Blue Plus。
4. **往重悬液中加入 250µl Buffer P2，颠倒混匀 8~10 次。**  
颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。
5. **加入 250µl Buffer N3，立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。**  
加入 Buffer N3 后，应立即颠倒混匀。充分混匀后，产生的絮状沉淀最终是均一白色的。
6. 13,000 × g 离心 10 分钟。
7. 转移 500µl 上清液至新的 1.5ml 离心管中。
8. **加入 250µl Bind Beads，涡旋混匀 10 秒，静置 3~5 分钟，其间颠倒混匀数次。**转移至磁力架上吸附 3 分钟，吸弃或倒弃所有的溶液。
9. (可选，彻底去除 RNA 污染) **加入 250µl Buffer PW1，涡旋混匀 15 秒，转移至磁力架上吸附 1 分钟。**吸弃溶液。
10. **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。
11. (可选)重复第 9 步一次。
12. 短暂离心，吸弃所有溶液，空气干燥 5 分钟。
13. **加入 50~80µl 灭菌水，混匀 20 秒，室温静置 3 分钟。**
14. 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 深孔板中，加入 0.7~1ml 2 x YT 或 TB 培养液，将含目的质粒的菌种接种于每个孔中，贴上可透气的封口膜或盖上盖子。37°C，220rpm 摇床培养 20~24 小时扩增质粒。2,500-3,000 × g 离心 10 分钟收集菌体。
2. 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。**每孔中加入 250µl Buffer P1/RNase A 混和液**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，最高速度涡旋 3-5 分钟重悬细菌。  
彻底重悬细菌对产量很关键，充分重悬后应看不到细菌团块。Blue Plus 可以预先加入 Buffer P1/RNase A，以起到监控裂解的作用。按每 ml Buffer P1 加入 4ul Blue Plus。
3. **每孔中加入 250µl Buffer P2**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600rpm 振荡混匀 5 分钟。  
颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。
4. **每孔中加入 250µl Buffer N3**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600rpm 振荡混 5 分钟。  
加入 Buffer N3 后，应立即颠倒混匀。充分混匀后，产生的絮状沉淀最终是均一白色的。
5. 3,000~5,000 × g 离心 20 分钟。
6. 用 8 通道移液枪转移 500µl 上清液至新的 1.1ml 或 2.2ml 的 96 孔板中。
7. **加入 250µl Bind Beads**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，700~900rpm 振荡混 2 分钟。室温放置 10 分钟。
8. 转移至磁力架上吸附 3~5 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. （可选，彻底去除 RNA 污染）**加入 250µl Buffer PW1**，**涡旋混匀 15 秒**，转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。
10. **加入 500µl 75%乙醇**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，700~900rpm 振荡混 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。
11. 重复第 10 步一次。让磁力架和 96 孔板反扣于吸水纸 3 分钟彻底吸弃残液。
12. 空气干燥 15~30 分钟。
13. **加入 50~80µl 灭菌水**，**振荡混匀 30~60 秒**，**室温静置 3 分钟**，700~900rpm 振荡混 1 分钟。
14. 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. 移液工作站流程设计

1. 在 96 深孔板中，加入 0.6~1ml 2 x YT 或 TB 培养液，将含目的质粒的菌种接种于每个孔中，贴上可透气的封口膜或盖上盖子。37°C，220rpm 摇床培养 20~24 小时扩增质粒。
2. 2,500-3,000 × g 离心 10 分钟收集菌体。
3. 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。**每孔中加入 250µl Buffer P1/RNase A 混和液**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，最高速度涡旋 3-5 分钟重悬细菌。  
彻底重悬细菌对产量很关键，充分重悬后应看不到细菌团块。Blue Plus 可以预先加入 Buffer P1/RNase A，以起到监控裂解的作用。按每 ml Buffer P1 加入 4ul Blue Plus。
4. **加入 250µl Buffer P2**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600rpm 振荡混匀 5 分钟。  
颠倒混匀不要涡旋。充分裂解后，整个溶液变成均一的蓝色溶液而且透亮。
5. **加入 250µl Buffer N3**，放置于 IKA MS3 涡旋仪上，300-600rpm 振荡混 5 分钟。  
加入 Buffer N3 后，应立即颠倒混匀。充分混匀后，产生的絮状沉淀最终是均一白色的。
6. 3,000~5,000 × g 离心 20 分钟。
7. 用移液工作站转移 500µl 上清液至新的 96 孔板中。
8. **加入 250µl Bind Beads**，振荡混匀 60~120 秒，静置 10 分钟。转移至 96 孔磁力架上吸附 3~5 分钟。吸弃所有的溶液。
9. (可选，彻底去除 RNA 污染) **加入 250µl Buffer PW1**，涡旋混匀 15 秒，转移至磁力架上吸附 1 分钟。吸弃溶液。
10. **加入 500µl 75%乙醇**，振荡混匀 30~60 秒，转移至磁力架上吸附 2 分钟。吸弃溶液。
11. (可选)重复第 10 步一次。
12. 空气干燥 15~20 分钟。
13. 加入 50~80µl 灭菌水，荡混匀 30~60 秒，室温静置 3 分钟。
14. 转移至磁力架上吸附 2 分钟，把 DNA 转移至新的 96 孔板中。