

M5 Easy-High Extreme-endotoxin Plasmid Maxi Kit

“易高得” 极限无内毒素质粒大提 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Easy-High Extreme-endotoxin Plasmid Maxi Kit	10T	MF995-01

【储存条件】

15-25℃干燥条件下，可保存 12 个月；更长时间的保存可置于 2-8℃。单独包装的 RNase A 在室温可稳定保存 12 个月。加入 RNase A 后的 Solution I 应置于 2-8℃保存，可稳定保存 6 个月。若溶液 II 和 N4 产生沉淀，应在使用前置于 37℃下溶解沉淀后再使用。

【产品简介】

本试剂盒适用于无内毒素高纯度质粒 DNA 的大量制备与纯化，柱上去除内毒素，操作简单。菌体经改良的碱裂解处理，质粒可从菌体中释放出来，并特异、高效地被离心柱硅胶膜吸附。通过去蛋白液和漂洗液的清洗可去除蛋白及其他杂质，最后得到高纯度的无内毒素质粒 DNA，所得质粒可直接用于酶切、转化、PCR、测序、细胞转染等分子生物学实验。高拷贝质粒，100ml 菌液通常能提到 500-1500ug 质粒，低拷贝质粒，200ml 菌液通常能提到 200-600ug 质粒（提取效率优于市面上其他品牌同等产品）。

【产品特色】

1. 快捷、高效：颜色变化，适合判断；操作简便，得率高，节约时间；
2. 纯度高：沉淀致密，去杂干净；
3. 内毒素去除简单：柱上去除内毒素，方便快捷，清除干净。

【产品组份】

试剂盒成分	10 T
Buffer BL	25 ml
Solution I	100 ml
Solution II	100 ml
Solution N4	100 ml
Buffer ER	30 ml
ToxinOut Buffer	60 ml
Buffer WB2 (concentrate)	60 ml
Buffer EB	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	1 ml
MaxiSpin Columns with Collection Tubes (50 ml)	10 个
Collection Tubes (50 ml)	10 个

注意：使用前将全部 RNase A 溶液加到 Solution I 中混合均匀，2-8℃保存；按要求在 Buffer WB2 中加入无水乙醇）

【注意事项】

1. 细菌培养时间一般为 12-16 小时（用锥形瓶或者试管摇菌，**摇瓶的体积是菌液量的 3-5 倍**，留够足够的空间让细菌接触空气，利于细菌生长），如接种量大则应减少培养时间，过度培养会降低质粒质量甚至导致质粒 DNA 突变；
2. 每次使用时都要注意 Solution II 和 N4 是否形成沉淀，如有沉淀 37℃ 溶解后再用；
3. 加入 Solution II 裂解细菌，直至溶液成紫红色粘稠透明状，时间过长会导致质粒 DNA 打断变性；
4. 质粒的产量跟细菌量、质粒拷贝数、质粒大小和操作规范程度密切相关。

【操作步骤】

柱平衡：向吸附柱中（吸附柱放入收集管中）加入 2.5 ml 的平衡液 BL，10,000 rpm 离心 2 min，弃收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

1. 取 100 ml（低拷贝质粒可收集更多菌液，最高 200ml 菌液）过夜培养的菌液，室温 10,000 rpm 离心 2 min，弃上清。
2. 加入 10 ml Solution I，旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀，呈现出均匀混浊的棕红色。

注意：菌体沉淀一定要悬浮均匀，如有未彻底悬浮的菌块会影响裂解，导致提取的质粒浓度及纯度降低。

3. 加入 10 ml Solution II，温和颠倒混匀使菌体完全裂解，直到溶液变成清亮、粘稠的紫红色。

注意：不可剧烈震荡，以免造成基因组 DNA 片段的污染，所用时间不要超过 5 min，以免质粒受到破坏，如未完全变得清亮，可能是菌体太多，可增加 Solution II 的用量，在后续的操作中 Solution N4 的用量也要相应增加。

4. 加入 10 ml Solution N4，立即温和颠倒混匀，可见红黄相间的絮状物产生，继续混匀直到完全变为黄色，然后 10,000 rpm 离心 5-10 min。

注意：1) Solution N4 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀，如果上清中还有紫色漂浮物，说明复性不充分，继续混匀至溶液颜色完全变为澄清的黄色。

2) 离心后在最上层可能会形成一层致密的漂浮膜，注意不要倒入吸附柱。

（如果实验室离心机采用吊篮式，不是固定转子，转速达不到 10000rpm，可以采用吊篮离心的最大转速 4250g，离心 10min）

5. 将上清转移至干净离心管（自备）中，加入 3 ml 内毒素去除液 Buffer ER，混匀。

注意：如果要得到内毒素更低的质粒，可将混合液冰浴 10-20 min，然后 42℃ 水浴 5 min，5000 rpm 离心 3 min，将上清转移到一新的 50 ml 离心管中（自备），最好用 50ml 尖底管，使油状物集中在狭窄的管底部，不要吸取下层油状物。

6. 对于高拷贝质粒加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，对于低拷贝质粒加入 0.2 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀。

注意：加入异丙醇**有时会有质粒凝结析出，不要丢弃，一同倒入吸附柱中**，加入过多异丙醇容易导致 RNA 污染。

7. 将步骤 6 中液体与异丙醇的混合溶液转移到平衡好的吸附柱中（使用当天用平衡液处理的吸附柱，放入 50 ml 收集管中），10,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中的滤液。

注意：吸附柱的最大容积为 15 ml，所以上步中所得溶液分多次过柱。如果离心机转子倾角较大时，建议加入吸附柱的溶液体积不超过 10 ml，以防发生漏液现象。

8. 向吸附柱中加入 5 ml ToxinOut Buffer，室温静置 2 min，10,000 rpm 离心 1 min，弃收集管中滤液。

9. 加入 10 ml Buffer WB2, 室温 10,000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中滤液。

注意: Buffer WB2 为浓缩液, 按要求加入无水乙醇, 用后应立即盖紧瓶盖, 以防酒精挥发。

10. 加入 5 ml Buffer WB2, 室温 10,000 rpm 离心 1 min, 弃收集管中滤液。

11. 室温 10,000 rpm 离心 5 min, 甩干残留液体。

12. 将离心吸附柱置于一个新的 50 ml 塑料离心管中, 打开管盖, 放置 5 min, 使乙醇彻底挥发干净。

13. 加入 1-2 ml 洗脱液 Buffer EB, 室温放置 2 min, 10,000 rpm 离心 2 min, 离心管底溶液即质粒 DNA。

注意: 如果质粒浓度非常高, 一次洗脱仅能回收大概 60-70%左右的质粒, 为增加洗脱效率(尤其是>5kb 以上的质粒), 可将得到的质粒溶液重新加入到吸附柱中重复收集 2 到 3 次, 可以获得最大洗脱效率。如需使用去离子水洗脱, 可用 NaOH 调整其 pH 值在 7.0 - 8.5 之间。

【低拷贝或大质粒 (>10 kb) 提取】

低拷贝质粒, 或>10 kb 的质粒, 或提取农杆菌质粒, 或提取革兰氏阳性菌质粒, 应加大菌体使用量, 使用 300-500 ml 过夜培养物, 最后洗脱液 Buffer EB 60℃水浴预热, 吸附和洗脱时可以适当延长时间, 以增加提取效率。其它步骤相同。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。