

M5 Vac Endofree Hipure plasmid Maxi kit

抽滤法无内毒素质粒大提（适合抽滤，不离心）（Version 2）

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Vac Endofree Hipure plasmid Maxi kit	10T	MF876-01

【储存条件】 室温；加入 RNase A 后的 Solution I 可 4°C 保存 6 个月；若溶液 II 产生沉淀，使用前置于 37°C 溶解后再使用。

【产品简介】

本试剂盒用于无内毒素质粒大量制备。在碱裂解处理后，质粒从菌体中释放出来，并特异、高效地被离心柱硅胶膜吸附，并在柱上去除内毒素，操作简单。通过去蛋白液和漂洗液的清洗可去除蛋白及其他杂质，最后得到无内毒素质粒 DNA（内毒素残留 ≤ 1 EU/ μg ）。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。质粒提取得率不仅与试剂盒有关，也与质粒大小有关，**质粒越大，拷贝数越低，得率就越低**。小质粒（ $<10\text{kb}$ ）拷贝数高，100ml 菌液通常能提到 500-1500ug 质粒；大质粒（ $>10\text{kb}$ ）拷贝数低，200ml 菌液通常能提到 200-600ug 质粒。本试剂盒**真实提取效率**优于市面上其他品牌。**谨防其他品牌 OD 虚高，请跑电泳确定提取的质量和浓度，而不是只看 OD 值。OD 值无法确保提取质粒的质量，因为 RNA 污染或蛋白污染都会增大 OD 值，对 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值影响很小。**

【产品特色】

- 裂解物离心彻底，可以直接倒，免去推柄除蛋白，**极大降低蛋白污染导致 OD 值虚高的问题。**
- 不用推柄，操作简便，对女同学操作友好，而且极大节约时间，**比竞品缩短 1 个小时；**
- 内毒素去除简单：柱上去除内毒素，方便快速，清除彻底，更适合下游转染。

【产品组份】

试剂盒成分	10 T
Buffer BL	25 ml
Solution I	100 ml
Solution II	100 ml
Solution N3	100 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°C 保存；按要求在 Buffer WB2 中加入无水乙醇)

【注意事项】

- 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；
- 培养好的菌液及时收集菌体并提取质粒；若摇好的菌不能马上提质粒，尽量收集菌体后置于 4 度保存，而不是保存菌液。
- 每次使用时都要注意 Solution II 和 N3 是否形成沉淀，如有沉淀 37°C 加热溶解后再用；
- 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，8,000 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，别嫌这步麻烦，它能带来近 10-20%回收效率的提升，强烈建议不要省去此步！）

1. 取 100 ml 过夜培养的菌液，室温 10000 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，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 Buffer N3 的用量也要相应增加。

4. 加入 10 ml Buffer N3，稍微用力立即颠倒混匀，可见红黄相间的沉淀物产生，继续混匀直到完全变为分散的黄色漂浮物，然后 10,000 rpm 离心 5-10 min。

注意：Buffer N3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。

5. 将上清液转移到一新的 50ml 离心管中，加入 0.3 倍体积的异丙醇，混匀。

6. 将吸附柱连接到抽滤装置，然后将上清液转移到离心吸附柱中（使用当天用平衡液处理的吸附柱，放入 50ml 收集管中），打开抽滤装置开关开始抽滤，上清液抽滤完成关闭开关，弃滤液。

注意：吸附柱最大容积是 15 ml，分多次转入。

7. 向吸附柱中加入 5 ml ToxinOut Buffer，室温静置 5 min，打开抽滤装置开关开始抽滤，上清液抽滤完成关闭开关，弃滤液。

8. 加入 10 ml Buffer WB2，打开抽滤装置开关开始抽滤，上清液抽滤完成关闭开关，弃滤液。

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。

9. 重复步骤 8 一次。

10. 将离心吸附柱置于试剂盒提供的 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。

11. 加入 0.5ml ~ 1.5 ml 洗脱液 Buffer EB，室温放置 2 min，10000 rpm 离心 2 min，离心管底溶液即质粒 DNA。

注意：一次洗脱仅能回收大概 60%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三到四次，以获得最大洗脱效率。Buffer EB 成分单一，不会影响下游的酶切，转染或者其他分子生物学实验，请放心使用。不提倡用去离子水洗脱，如必须使用去离子水洗脱，请先用 NaOH 调整其 pH 值在 8.0 - 8.5 之间后才用于洗脱。

【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°C 水浴预热，吸附和洗脱时可以适当延长延长时间，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。