

# M5 HiPure Plasmid Midi Kit

## 高纯度质粒中提试剂盒（5-15ml 菌液）

### 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPure Plasmid Midi Kit	50T	MF076-01

#### 【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 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】

本试剂盒适用于高纯度质粒 DNA 的中量制备。菌体经碱裂解、高盐、低 pH 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。然后通过清洗液的清洗可去除蛋白及其他杂质，最后在低盐、高 pH 条件下洗脱得到高纯度无内毒素的质粒 DNA。使用本试剂盒可从 5 ~ 15 ml 过夜培养的菌液中纯化得到高达 70 ug 的质粒 DNA，所得质粒除可用于常规分子生物学实验。

#### 【产品特色】

1. 快捷、高效：操作简便，得率高，节约时间；
2. 纯度高：沉淀致密，去杂干净；

#### 【产品组份】

试剂盒成分	50T
Buffer BL	25 ml
Solution I	30 ml
Solution II	30 ml
Solution III	30 ml
Buffer WB1 (concentrate)	13 ml
Buffer WB2 (concentrate)	15 ml
Buffer EB	10 ml
RNase A (10 mg/ml)	300 ul
MiniSpin Column With Collection Tubes	50 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 WB1 和 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，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. 每次使用时都应注意 Solution II 和 III 是否形成沉淀，如有沉淀 37℃溶解后再用；
3. 注意溶液 I, II 和 III 的用量比例，若细菌量增大，需按比例放大这些溶液的使用量；
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 400  $\mu$ l 的平衡液 BL，12,000 rpm (-13,400 $\times$ g) 离心 1 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 5 ~ 15 ml 过夜培养的菌液，室温 12,000 rpm 离心 1 min，尽量将上清去除干净。

（注意：根据菌液的浓度决定取液量，浓度高时取 1.5 ml 菌液离心即可，浓度低时可多收集一次）

2. 加入 500  $\mu$ l 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 500  $\mu$ l 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 III 的用量也要相应增加）

4. 加入 500  $\mu$ l Solution III，立即温和颠倒混匀，可见红黄相间的沉淀物产生，继续混匀直到完全变为黄色，然后 12,000 rpm 离心 10 min，将上清液转移到一干净的离心管中，加入 500  $\mu$ l 异丙醇混匀。

（注意：Solution III 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）

5. 将混合液转移到离心吸附柱中，12,000 rpm 离心 0.5min，弃收集管中滤液。

（注意：吸附柱一次只能转移 750 $\mu$ l 液体，剩余液体分次转入）

6. 加入 500  $\mu$ l Buffer WB1，室温 12,000 rpm 离心 0.5 min，弃收集管中滤液。

（注意：Buffer WB 1 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）

7. 加入 600  $\mu$ l Buffer WB2，室温 12,000 rpm 离心 0.5 min，弃收集管中滤液。

（注意：Buffer WB 2 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）

8. 加入 500  $\mu$ l Buffer WB2，室温 12,000 rpm 离心 2 min，甩干残留液体。

（注意：此步不能省略，否则残留乙醇会影响质粒的后续使用）

9. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 ml 塑料离心管（自备）中，加入 100 ~ 200  $\mu$ l 的洗脱液 Buffer EB，室温放置 2 min。12,000 rpm 离心 1 min，离心管底溶液即质粒 DNA。

（注意：为增加洗脱效率，可将洗脱液在 60 $^{\circ}$ C 预热。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，为了增加质粒回收率，可将得到的溶液重新加入到离心管中，室温放置 2 min，再次离心收集）

## 【低拷贝或大质粒 (>10 kb) 提取】

如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒，应加大菌体使用量，使用 10-30 ml 过夜培养物，同时按照比例增加 Solution I、II、III 的用量，洗脱液 Buffer EB 应在 60 $^{\circ}$ C 水浴预热，在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。