

# M5 HiPer 农杆菌质粒小提试剂盒

## 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer 农杆菌质粒小提试剂盒	50T	MF1060-01

### 【储存条件】

在室温(15~25°C)干燥条件下,可保存12个月;更长时间的保存可置于2~8°C。若溶液II产生沉淀,应在使用前置于37°C下溶解沉淀。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°C保存,可稳定保存6个月。

**RNase A、Lysozyme Solution (50 mg/ml) 置于-20°C保存。**

### 【产品简介】

本试剂盒专门针对低拷贝质粒,或提取农杆菌质粒,或提取革兰氏阳性菌质粒,或大于10 kb的大质粒而开发。利用多彩的颜色变化,监控质粒提取的每步过程,让实验变得高效并轻松有趣。本试剂盒用于高纯度质粒DNA的小量制备。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、高效地被离心吸附柱吸附。通过清洗液的洗涤可去除杂质,在低盐、高pH条件下洗脱,最后得到ug级别纯度较高的质粒DNA。使用本试剂盒每次可处理5ml过夜培养的菌液,可在30 min之内完成提取任务。所得质粒可直接用于酶切、转化、PCR、测序等各种分子生物学实验。

### 【产品组份】

试剂盒成分	MF1060-01
Solution I	15 ml
Solution II	15 ml
Solution III	20 ml
Buffer WB1 <b>按要求在 Buffer WB1 中加入无水乙醇</b>	13 ml
Buffer WB2 <b>按要求在 Buffer WB2 中加入无水乙醇</b>	15 ml
Buffer EB	10 ml
Buffer BL	25ml
RNase A (10 mg/ml)	150 ul
Lysozyme Solution (50 mg/ml)	1ml
MiniSpin Column With Collection Tubes	50 套

(注意:使用前将全部RNase A溶液加到Solution I中混合均匀,然后2-8°C保存)

### 【产品特点】

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。
3. 含有指示剂,可直观判断操作过程中样本裂解程度。

### 【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,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. 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。
3. 随菌体增多应延长Solution II的作用时间,直至溶液成粘稠透明状,但时间过长会导致质粒DNA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。
5. 纯化的质粒在电泳中表现为2~3条带有时甚至为4~6条带均属正常,未分开的环套质粒,易被误判为基因组DNA。

**【操作步骤】**

1. 柱平衡：向离心吸附柱中加入 400  $\mu$ l Buffer BL，静置 1 min，室温下 12,000 rpm 离心 1 min，弃除收集管中的废液，将离心吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的吸附柱）
2. 取 1~5 ml（如果是低拷贝质粒可以收集更多菌液）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。**
3. 加入 250  $\mu$ l Solution I，旋涡震荡或用移液器充分吹打使菌体重悬均匀，呈现出均匀浑浊的**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。**
4. 加入 50  $\mu$ l 溶菌酶溶液使其终浓度为 10 mg/ml，混匀，37 $^{\circ}$ C 处理 30 min。  
**注意：加入溶菌酶的浓度和处理的时间可根据不同的菌株和具体实验条件进行调整。**
5. 加入 250  $\mu$ 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。**
6. 加入 350  $\mu$ 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**，室温静置 2 min，然后 12,000 rpm 离心 5 min。  
**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。**
7. 小心将上清液转移到离心吸附柱中，静置 2 min，让质粒与吸附柱硅胶膜充分结合。12,000 rpm 离心 30 sec，弃收集管中滤液。
8. 【可选步骤】向吸附柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WB1，12,000 rpm 离心 30 sec，弃收集管中滤液。  
**注意：如果宿主菌是 endA<sup>-</sup>，如 DH5 $\alpha$  或 TOP10，此步骤可省略。如果宿主菌是 endA<sup>+</sup>，如 TG1、BL21、HB101、JM101 等，此步骤不可省略，因这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒。如果提取低拷贝质粒也推荐采用此步骤。**
9. 加入 500  $\mu$ l Buffer WB2，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃收集管中滤液。  
**注意：Buffer WB 2 为浓缩液，初次使用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. 重复步骤 8 一次。
11. 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。**
12. 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 50~100  $\mu$ 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。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。如需使用去离子水洗脱，可用 NaOH 调整其 pH 值在 8.0 - 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。**

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。